

**Aus dem Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung I  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Lehrstuhl für Pflanzenzüchtung  
Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. Wolfgang Friedt**

**Analytik von Faserkomponenten der Rapssaat (*Brassica  
napus* L.) als Basis für die züchterische Optimierung der  
Schrotqualität**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Agrarwissenschaften**

– Dr. agr. –

im Fachbereich  
Agrarwissenschaften, Ökotrophologie und Umweltmanagement der  
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Dipl.-Ing. agr. Benjamin Wittkop  
aus Biskirchen, Hessen

Gießen, im März 2012

*„Die Pflanzenzüchtung hat das Ziel, Pflanzen genetisch so zu verändern, daß sie besser an die Bedürfnisse des Menschen angepaßt sind.“*

Prof. Dr. Heiko Becker

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Raps ( <i>Brassica napus</i> L.): Deutschlands führende Ölpflanze .....	1
1.2	Züchtung auf verbesserte Rapsschrot- bzw. Rapsmehlqualität .....	5
1.2.1	Reduktion wertmindernder phenolischer Substanzen im Rapsschrot .....	8
1.2.2	Verringerung und Analytik von Faserkomponenten in Raps .....	12
1.3	Züchtung und genetische Determination des Merkmals „Gelbsamigkeit“ .....	16
1.4	Einsatz der Nahinfrarot-Reflektionsspektroskopie (NIRS) in der Rapszüchtung.....	19
<b>2</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>23</b>
3.1	Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe.....	23
3.2	Regional association analysis delineates a sequenced chromosome region influencing antinutritive seed meal compounds in oilseed rape .....	34
3.3	New NIRS calibrations for fibre fractions reveal a broad genetic variation in <i>Brassica napus</i> seed quality .....	47
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>57</b>
4.1	Entwicklung von NIRS-Kalibrationen für verschiedene Faserfraktionen in intakten Rapssamen .....	57
4.2	Zusammenhänge zwischen Samenfarbe, Fasergehalt sowie Öl- und Proteingehalt und ihre Bedeutung für die Körnerölrapszüchtung.....	60
4.3	Analytik phenolischer Samenschalenkomponenten.....	62
4.4	Vererbung des Fasergehaltes als Grundlage für die Züchtung auf reduzierte Fasergehalte in Raps.....	64
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Summary .....</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>71</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungs-, Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>80</b>

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Winterraps (*Brassica napus* L.): Deutschlands führende Ölpflanze

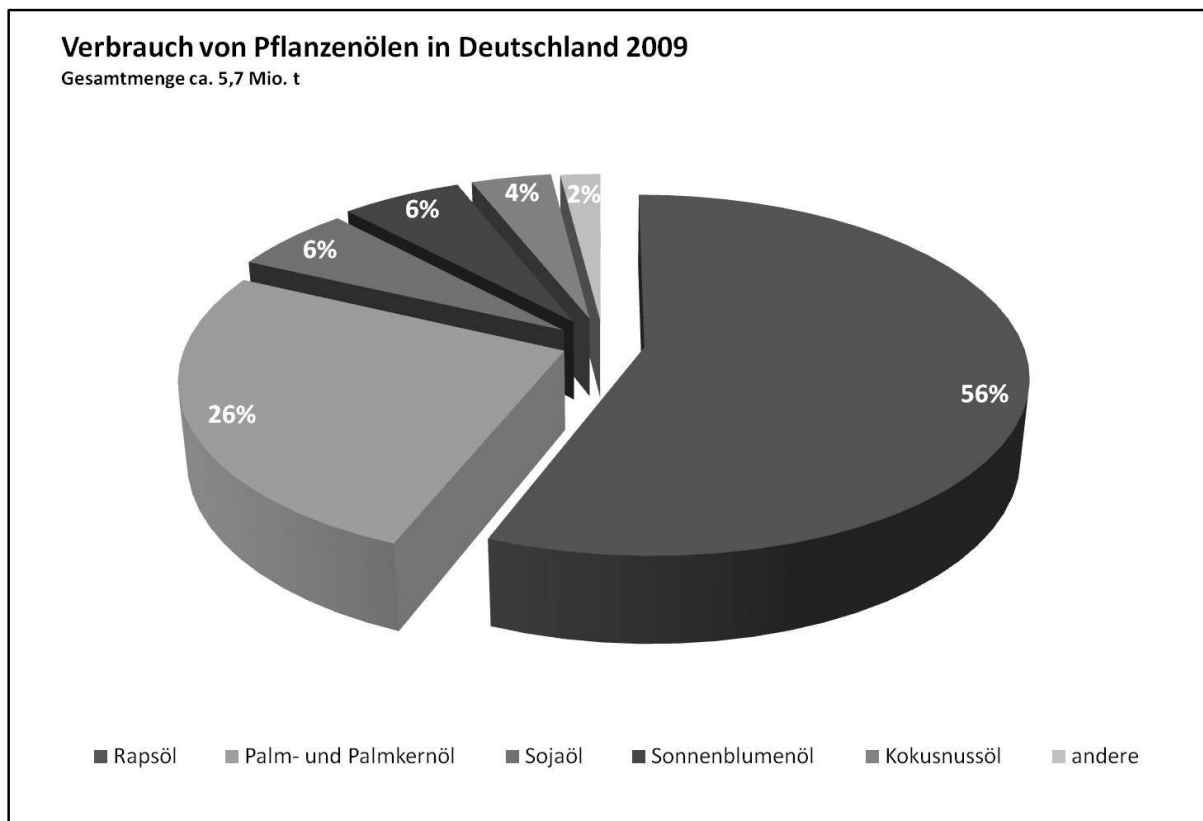
Raps (*Brassica napus*) ist eine der bedeutendsten Ölpflanzen weltweit. Die „Rapssaat“, weltweit gewonnen aus verschiedenen *Brassica*-Arten, rangiert mit einer Jahresproduktion von 61,7 Mio. t in 2009 hinter der Sojabohne (223,2 Mio. t) an zweiter Stelle (www.FAOSTAT.com). In Deutschland ist Winterraps die wichtigste Ölpflanze mit einer durchschnittlichen Anbaufläche von ca. 1,4 Mio. ha und einer Gesamterntemenge von ca. 5,5 Mio. t im Fünfjahresmittel (DBV Erntebericht 2011). Dazu trägt im Wesentlichen auch das hohe Ertragsvermögen mit durchschnittlichen Hektarerträgen von 38,3 dt/ha (Fünfjahresmittel) unter nord- und mitteleuropäischen Anbaubedingen bei.

Vor allem die züchterische Verbesserung der inneren Samenqualität war dafür verantwortlich, dass Raps heutzutage eine dominierende Stellung im heimischen und europäischen Ölfruchtanbau einnimmt. In erster Linie werden die Rapssamen aufgrund hoher Ölgehalte von 40-50% als Öllieferant im Nahrungsmittelsektor eingesetzt. Die ernährungsphysiologisch günstige Fettsäurezusammensetzung mit hohen Gehalten der essentiellen Ölsäure von bis zu 60% bei gleichzeitig hohen Anteilen mehrfach ungesättigter Fettsäuren, wie der Linolsäure mit ca. 20% und der Linolensäure mit etwa 10%, machen das Rapsöl zu einem der wertvollsten Speiseöle. Jedoch wurde das Rapsöl erst Anfang der 1970er Jahre vermehrt für die Verwendung als Speiseöl genutzt, nachdem die Züchtung neuer Rapssorten mit sogenannter einfach Null-Qualität (0-Rapssorten) gelungen war. Die Öle solcher Rapssorten weisen im Gegensatz zu den ursprünglichen Sorten einen genetisch niedrigen Gehalt, der für die Ernährung unerwünschten Erucasäure auf (Grenzwert für die Sortenzulassung 2% der Gesamtfettsäuren). Erucasäurehaltige Pflanzenöle stehen in Verdacht bei erhöhtem Verzehr zur Verfettung des Herzmuskels mit einhergehenden kardiovaskulären Erkrankungen zu führen, was in Fütterungsversuchen mit Ratten auch beobachtet wurde (Kramer *et al.* 1983). Dieses wichtige Qualitätsmerkmal wurde erstmals von Stefansson *et al.* (1961) in mutierten Einzelpflanzen der deutschen Sommerrapssorte ‚Liho‘ entdeckt und durch Rückkreuzungen in bestehendes kanadisches Sommerrapsmaterial eingekreuzt (Downey & Harvey 1963, Harvey & Downey 1964). So entstanden im Anschluss neue Sorten mit der heute noch gebräuchlichen *Canola*-Ölqualität (**can**adian **oil** **low** **acid**). Diese ersten erfolgreichen Züchtungen waren dann auch die entscheidende Grundlage für die Züchtung der ersten in Deutschland zugelassenen 0-Winterrapssorte ‚Lesira‘ im Jahr 1973.

In den folgenden Jahren erlangte das einst kritisch betrachtete Rapsöl mehr und mehr an Bedeutung in der Nahrungsmittelindustrie und eine weitere Verbesserung der inneren Samenqualität Anfang der 1980er Jahre sorgte für eine erneute Steigerung der Anbauflächen und Verwendungsmöglichkeiten von Winterraps. In dieser Zeit gelang die Züchtung von Rapssorten mit der heute dominierenden Doppel-Null-Qualität (00-Rapssorten). Solche Sorten zeichnen sich neben niedrigem Erucasäuregehalt zusätzlich durch niedrige Gehalte an Glucosinolaten (GSL, Senfölglycoside) aus. Glucosinolate haben ihren Ursprung im Sekundärstoffwechsel der Pflanze und stellen vor allem in Raps die wichtigste limitierende Substanz für die Verwendung der Samen als wertvolles Eiweißfuttermittel in der Tierernährung dar (Schöne 1993). Diese schwefelhaltigen Substanzen besitzen überwiegend wegen des bitteren, adstringierenden Geschmacks und einer damit verbundenen herabgesetzten Futterakzeptanz durch die Nutztiere einen antinutritiven Charakter. Ferner wird bei dem enzymatischen Abbau der verschiedenen Glucosinolate durch das Enzym Myrosinase, welches bei einer Zellbeschädigung freigesetzt wird, die Bildung sogenannter Iso-Thiocyanate gefördert (Naczki *et al.* 1998). Diese mitunter toxischen Substanzen werden bei übermäßigem Verzehr in Verbindung mit einem überdurchschnittlichen Zuwachs der Schilddrüsenmasse gebracht (Schöne 1993). Das Merkmal deutlich reduzierter Glucosinolatgehalte geht auf Einzelpflanzen der polnischen Sorte ‚Bronowski‘ zurück und wurde in bestehendes 0-Winterrapsmaterial eingekreuzt, um letztendlich 00-Sorten mit durchschnittlichen Gehalten von 18 µmol Glucosinolaten/g Samen zu züchten. Die Winterrapssorte ‚Librador‘ war 1981 die erste zugelassene Sorte die beides, niedrige Erucasäure- und Glucosinolat-Gehalte, miteinander kombinierte.

Durch die Züchtung erucasäure- und glucosinalatarmer Sorten kann nun neben der Verwendung des Samenöles auch das Rapsschrot bzw. Rapsmehl, als Rückstand der Ölextraktion, in der Tierernährung als wertvolles Proteinfuttermittel eingesetzt werden. Folglich konnte eine weitere Steigerung der Anbauflächen sowie eine stetig wachsende Akzeptanz für die aus Winterraps gewonnenen wertvollen Produkte beobachtet werden. Es ist daher nicht verwunderlich, dass Rapsöl im Jahr 2009 mit 56% am gesamten Pflanzenölverbrauch in Deutschland den bedeutendsten Anteil an verarbeitetem Pflanzenöl darstellt (Abbildung 1). Die vielseitigen Verwendungsmöglichkeiten des Rapsöles als hochgeschätztes Speiseöl und insbesondere als wichtigster Rohstoff für die Biodieselproduktion erklären diese hervorragende Positionierung, wobei der weitaus größte Teil des Rapsöles (ca. 60%) für die Biodieselproduktion und etwa 30% für die Speiseöl- und

Nahrungsmittelproduktion verwendet werden. Die fehlenden ca. 10% finden einen Einsatz bei der Herstellung technischer Öle. (UFOP Markinformationen November 2011).

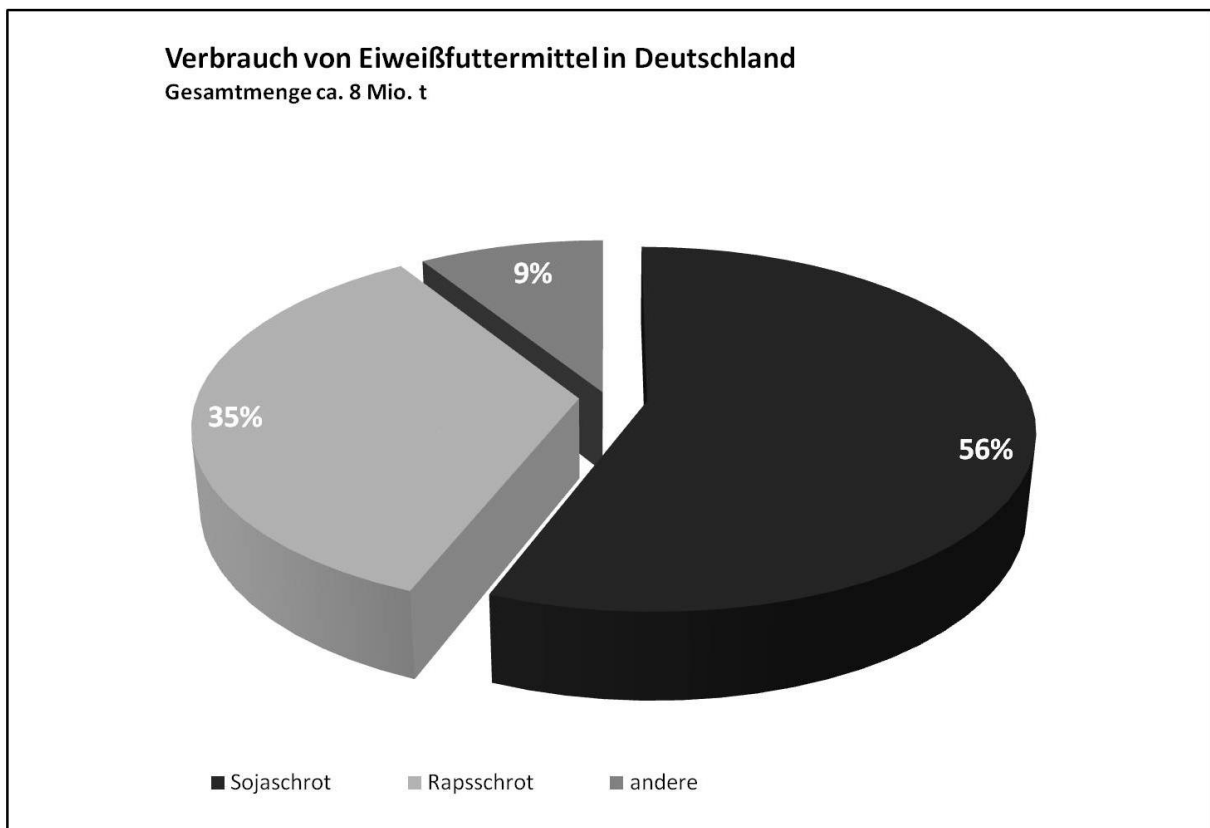


**Abbildung 1:** Verbrauch von Pflanzenölen in Deutschland 2009 ([www.oilworld.biz](http://www.oilworld.biz))

Dies verdeutlicht, dass die Verwendung von Rapsöl im Biodieselsektor, begründet durch das Biokraftstoffquotengesetz, weiterhin der wichtigste Faktor für einen erfolgreichen Rapsanbau in Deutschland ist. Abbadi & Leckband (2011) vermuten eine weitere Nachfragesteigerung nach Rapsöl für die Biodieselproduktion innerhalb der EU und in den GUS-Staaten in den kommenden Jahren und stellen heraus, dass dadurch neue Herausforderungen für die Pflanzenzüchtung bezüglich Samenertrag, Ölertrag und –qualität sowie Schrotqualität auftreten werden.

Vor allem die Verbesserung der Schrotqualität spielt in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle, denn einerseits ist dadurch eine Steigerung des Verbrauches von Rapsschrot als Eiweißfuttermittel in der Tierfütterung möglich. Dies ist insbesondere durch die anhaltende Diskussion über den Einsatz von gentechnisch veränderten Sojaschrotprodukten in der Futtermittelindustrie bedeutsam, denn nach wie vor ist Sojaschrot aus überwiegend überseeischer Produktion mit einem Marktanteil von ca. 56% der bedeutendere und nachgefragtere Rohstoff (Abbildung 2). Andererseits kann durch die

verbesserten Rapsschroteigenschaften auch dem aktuell kontrovers diskutierten Thema ‚Tank oder Teller‘, wobei eine vermeintliche Konkurrenz zwischen dem Anbau von Kulturpflanzen für die Ernährung und für die Erzeugung von nachwachsenden Kraftstoffen zum Ausdruck kommt, begegnet werden. Durch eine Optimierung der dualen Verwertbarkeit von Rapsprodukten kann möglicherweise die öffentliche Wahrnehmung von Raps als wertvolle Kulturpflanze sowohl für die Verwendung im Non-Food- als auch im Food-Bereich noch deutlich verbessert werden.



**Abbildung 2:** Verbrauch von Eiweißfuttermitteln in Deutschland 2009 (www.oilworld.biz)

Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass noch einige Nachteile für eine vollwertige Verwendung des Rapsschrotes existieren, die vor allem durch die Präsenz einiger antinutritiver Stoffe bedingt sind. Um nun die Verwendungsmöglichkeiten weiter zu steigern, müssen die Gehalte der wertmindernden Inhaltsstoffe, wie Rohfaser (u.a. Lignin, Hemicellulose und Cellulose) und eine Reihe anderer wertmindernder phenolischer Substanzen (u.a. Tannine und Sinapine), reduziert werden. Hinsichtlich der Reduktion solcher antinutritiver Inhaltsstoffe wird aus Sicht der Pflanzenzüchtung der Entwicklung gelb- bzw. hellsamiger Rapsgenotypen eine große Bedeutung beigemessen. Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass hellsamige Genotypen aufgrund einer deutlich dünneren Samenschale auch

reduzierte Gehalte an Rohfaser und Tanninen bei einer gleichzeitigen Erhöhung der Öl- bzw. Proteingehalte aufweisen (Stringam *et al.* 1974, Shirzadegan & Röbbelen 1985, Bechyne 1987, Downey & Bell 1990, Thies 1994, vgl. Rahman & McVetty 2011). Bisher sind aber noch keine hellen Rapssorten zugelassen, da die Züchtung hier wegen der starken Umweltmodifikation des Merkmals Samenfarbe bisher nur bedingt erfolgreich war.

## 1.2 Züchtung auf verbesserte Rapsschrot- bzw. Rapsmehlqualität

Die Verwertbarkeit des Rapsmehles bzw. -schrotes gewinnt in der Futtermittelindustrie zunehmend an Bedeutung und bestimmt vermehrt die Marktleistung von Körnerölraps. Eine Verwertung des Rapsschrotes als hochwertiges Eiweißfuttermittel wurde grundsätzlich durch die züchterische Reduktion des Glucosinolat-Gehaltes und die Zulassung von 00-Rapssorten ermöglicht. Jedoch ist eine vollwertige Verwendung in der Tierernährung auf Wiederkäuer beschränkt und in der Fütterung von Monogastern (Hühner und Schweine) nur bedingt möglich (Spiekers & Südekum 2004, Jeroch *et al.* 2008, Quiniou *et al.* 2009). Vorrangige Eigenschaften des Rapsschrotes, die einen vollwertigen Einsatz begrenzen, sind der Rohfaseranteil, die Proteinqualität sowie die Proteinverdaulichkeit.

In Tabelle 1 sind die wichtigsten Schrotinhaltsstoffe von Rapsextraktionsschrot (RES) und Rapskuchen im Vergleich zum Konkurrenzprodukt Sojaextraktionsschrot (SES) dargestellt. Der Vergleich zeigt, dass RES mit einem Proteingehalt von 33,2% deutlich unter dem des Sojaschrotes (44,2%) liegt. Zudem ist der höhere Rohfaseranteil im Rapsschrot (12,8% vs. 7%) dafür verantwortlich, dass Rapsprodukte im Vergleich zu SES einen geringeren Gehalt an verwertbarer Energie und eine schlechtere Proteinverdaulichkeit aufweisen (Schöne 1993). Eine Verbesserung der Eiweißverdaulichkeit und -verfügbarkeit sowie eine Erhöhung des Energiegehaltes konnte bei Fütterungsversuchen von Rapsprodukten mit vorhergehender Schälung der Rapssamen beobachtet werden (Kracht *et al.* 2004, Matthäus 1998). Durch den Schälprozess führen geringere Rohfasergehalte zu einer verbesserten Eiweißverdaulichkeit und reduzierte Polyphenolgehalte zu einer erhöhten Verfügbarkeit des Proteins. Kracht *et al.* (2004) berichten von einer Steigerung der praecaecalen Proteinverdaulichkeit beim Schwein von 68-75% für Schrot aus ungeschälter Rapssaart, auf 74-78% für RES aus geschälten Rapssamen. Ferner konnte gezeigt werden, dass durch den Schälprozess der Gehalt an kondensierten Tanninen (Proanthocyanidine), je nach Rapssorte, um 26,0-81,2% gesenkt wird (Matthäus 1998). Dies verdeutlicht, dass vor allem in der Samenschale bedeutende antinutritive Komponenten, wie etwa die Polyphenole Tannin und Lignin sowie andere Faserstoffe, lokalisiert sind, die eine schlechte Verdaulichkeit hervorrufen (Marles & Gruber



2004). Dies ist insbesondere bei Raps von großer Bedeutung, da etwa ein Sechstel des Samens aus der Samenschale besteht und im Schrot der Schalenanteil sogar ein Drittel ausmacht (Schöne 1993). In der Literatur wird daher mehrfach auf eine Verringerung des Samenschalenanteils durch die Selektion von hell- bzw. gelbsamigen Rapsgenotypen hingewiesen (vgl. Friedt *et al.* 2002, Rahman & McVetty 2011).

**Tabelle 1:** Inhaltstoffzusammensetzung von Rapsextraktionsschrot (RES) und Rapskuchen im Vergleich zu Sojaextraktionsschrot (SES) (vgl. Lindermayer *et al.* 2010)

Inhaltstoffe	Einheit*	Rapskuchen		RES	SES-43
		15% Fett	8% Fett		
Futterkennzahlen					
ME	MJ	13,0	11,9	10,7	12,9
Rohfett	%	14,8	7,6	4,0	12,0
Rohprotein (RP)	%	31,7	32,3	33,2	44,2
Rohfaser	%	9,7	11,1	12,8	7,0
Stärke	g/kg	0	0	44	62
Zucker	g/kg	62	68	70	95
Aminosäuren (Proteinqualität)					
Lysin	g/kg	16,8	17,1	17,1	26,7
Lys. i. RP	%	5,3	5,3	5,2	5,9
Threonin	g/kg	13,9	14,2	15,2	17,1
Thr. i. RP	%	4,4	4,4	4,6	3,9
Tryptophan	g/kg	4,2	4,2	5,2	5,9
Try. i. RP	%	1,3	1,3	1,6	1,3
Methionin	g/kg	6,0	6,1	7,0	5,9
Met. i. RP	%	1,9	1,9	2,1	1,3
Cystein	g/kg	5,1	5,2	8,6	6,5
Cys. i. RP	%	1,6	1,6	2,6	1,5
Mineralien					
Ca	g/kg	6,1	6,1	7,4	2,7
P	g/kg	10,4	10,4	10,7	5,7
Na	g/kg	0,1	0,1	0,6	0,3
K	g/kg	13,2	13,2	12,9	19,0

\* bei 88% TS

Das Rohprotein der Rapssaat ist durchaus von erheblichem biologischem Wert und kann sowohl für die Tierernährung als auch für die Humanernährung als Eiweißträger herangezogen werden (Barth & Metges 2007). Das Rapssamenprotein setzt sich aus verschiedenen Albumin- und Globulinfraktionen zusammen. Das bedeutendste Speicherprotein mit einem Anteil von bis zu 60% bildet das Cruciferin, welches aufgrund seiner oligomeren Struktur den salzlöslichen 12-S-Globulinen zugeordnet wird. Eine weitere

Hauptfraktion bildet das Napin - ein heterogenes, stark basisches wasserlösliches 2-S-Albumin, welches charakteristisch höhere Gehalte der essentiellen schwefelhaltigen Aminosäuren aufweist (Schwenke 1990). Das Verhältnis der beiden Proteinfractionen (Cruciferin/Napin) zueinander zeigt eine große Spanne mit Werten zwischen 0,7 und 2 und variiert stark zwischen den verschiedenen Qualitätsgruppen, wobei 00-Sorten höhere Werte zeigen. Als Grund dafür führen Malabat *et al.* (2003) eine veränderte Aminosäurezusammensetzung der 00-Rapssorten aufgrund von Wechselwirkungen mit aliphatischen Glucosinolaten an.

Grundsätzlich zeigt die Aminosäurezusammensetzung von Rapsprotein einen ausreichenden Anteil an essentiellen Aminosäuren, um den Empfehlungen der FAO für Nahrungsproteine zu entsprechen (Thies 1994). Darüber hinaus ist in Tabelle 1 zu erkennen, dass Rapsprotein in seiner Zusammensetzung der wichtigsten Aminosäuren mit dem Sojaprotein konkurrieren kann. Lediglich die Anteile der für die Tier- und Humanernährung erstlimitierenden Aminosäure Lysin liegen unter den Gehalten des Sojaproteins. Dagegen zeigt das Rapssamenprotein im Vergleich erhöhte Gehalte der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein (Downey & Bell 1990, Bell 1993, 1995, Schöne 1993, Thies 1994).

Wegen der positiven Zusammensetzung ist ein erfolgreicher Einsatz von Rapsmehlprodukten in der Tierernährung möglich und belegt das Potential von Rapsprotein zur Aufrechterhaltung des Stickstoff- und Eiweißhaushaltes in tierischen Organismen (Barth & Metges 2007). Demzufolge, und durch die anhaltende Diskussion über die Nutzung von Sojaproteinisolaten aus überwiegend gentechnisch veränderten Sojabohnen, wird zunehmend auch der Einsatz von Rapsprotein in der Humanernährung verfolgt. Die Ergebnisse einer Studie, bei der ein Rapsproteinisolat mit 93% Eiweiß an Versuchspersonen verabreicht wird, zeigen, dass Rapsprotein mit 84% eine für pflanzliche Proteine vergleichsweise niedrige ileale wahre Verdaulichkeit aufweist (Bos *et al.* 2007). Dennoch schlussfolgern die Forscher, dass Rapsprotein trotz der niedrigeren Verdaulichkeit einen hohen biologischen Wert für den Menschen besitzt, und dass dieser mit dem von Milchprotein vergleichbar sei (Bos *et al.* 2007). Hierbei muss jedoch, wie zuvor schon erwähnt, beachtet werden, dass neben den Reserveproteinen noch weitere Eiweiße sowie niedermolekulare Verbindungen in den Samen zu finden sind, von denen die meisten hemmend auf die Eiweißverwertbarkeit wirken. Bei den Kruziferen sind hier die Glucosinolate, Sinapine, Tannine und weitere phenolische Verbindungen sowie die Faserkomponenten (insbes. Lignin) zu nennen (Fenwick *et al.* 1983, Thies 1994). Durch die Eliminierung dieser negativen Begleitstoffe und die Herstellung eines reinen Proteinisolates könnte der menschliche Bedarf an essentiellen und nicht-essentiellen

Aminosäuren befriedigt werden, und ein Einsatz in der Humanernährung wäre daher denkbar (Barth & Metges 2007).

Über eine gezielte Isolierung von Proteinen aus der Rapssaat für die menschliche Ernährung wird u.a. von der kanadischen Firma Burcon berichtet. Diese Firma hat sich mehrere Verfahren patentieren lassen, mit der durch Salz/Wasserextraktion und Ultrafiltration zwei verschiedene Proteinkonzentrate hergestellt werden können: das aus den Albuminen der Napin-Fraktion bestehende ‚Supertein‘ und das ‚Puratein‘, welches aus den Globulinen der Cruciferin-Fraktion besteht (Schweizer *et al.* 2007, [www.burcon.ca](http://www.burcon.ca)). Ein großflächiger Einsatz von Rapsproteinisolaten in der Humanernährung ist bislang noch nicht bekannt und aufgrund der ‚Novel Food‘ Verordnung noch nicht zugelassen. Die bisherige Zurückhaltung in der Rapsproteingewinnung ist zusätzlich durch die etwa gleichen Anteile der beiden Hauptproteinfraktionen Cruciferin und Napin, wodurch eine spezielle Technologie der Isolierung notwendig ist, und die Schädigung der Proteine durch die konventionelle Rapsverarbeitung erklärbar (Krause *et al.* 2007).

Aufgrund der vorliegenden Erkenntnisse liegt das pflanzenzüchterische Hauptinteresse für eine weitere Verbesserung der Rapsschrotqualität vor allem in der Reduktion der genannten antinutritiven Sameninhaltsstoffe.

### **1.2.1 Reduktion wertmindernder phenolischer Substanzen im Rapsschrot**

Bei Rapsschrotprodukten können phenolische Inhaltsstoffe mit antinutritiven Eigenschaften 30mal höhere Gehalte erreichen als in Sojaschrot (Kozłowska 1980, Shahidi & Naczki 1992, zum Felde 2007). In der Rapssaat bilden die phenolischen Säuren und die kondensierten Tannine (Bitterstoffe) die Hauptkomponenten dieser Stoffgruppe. Ihren unerwünschten und wertmindernden Charakter erhalten diese Stoffe aufgrund der durch die Komplexbildung hervorgerufene herabgesetzte Proteinverdaulichkeit, die dunkle Farbe, den bitteren Geschmack, den unangenehmen Geruch sowie die adstringierenden Eigenschaften (Naczki *et al.* 1998).

In Raps kommen Phenolsäuren in freier, veresterter und unlöslich-gebundener Form vor und stellen Benzoe- und Zimtsäurederivate dar, die ausgehend von der Aminosäure Phenylalanin im Phenylpropanoid-Stoffwechselweg gebildet werden (Naczki *et al.* 1998). Die Sinapinsäure macht dabei den Hauptanteil der freien Phenolsäuren aus. Quantitativ stellen allerdings die veresterten Phenolsäuren den größten Anteil dar, wobei der Cholinester der Sinapinsäure, das Sinapin (Sinapinchole), mit etwa 80% dominiert. Sinapin kann im Rapsmehl Gehalte von bis zu 3% erreichen und wird mit dem Auftreten von Fischgeruch in braunen Eiern nach

Fütterung der Legehennen in Verbindung gebracht (Qiao & Classen 2003). Zurückzuführen ist dieser Geruch auf die Akkumulation von Trimethylamin (TMA) in den Eiern. Sinapin wird durch Darmbakterien zu Sinapinsäure und Cholin hydrolysiert. Aus Cholin wird in einem weiteren Schritt TMA gebildet. Bei manchen Hennen – insbesondere solche, die braune Eier legen - existiert ein Defizit für das Enzym Trimethylaminoxidase, so dass TMA nicht oxidiert und durch die Niere ausgeschieden werden kann. Folglich wird das TMA in die sich entwickelnden Eier eingelagert (Qiao & Classen 2003). Desweiteren wird aufgrund des bitteren Geschmacks die Fraßakzeptanz negativ beeinflusst und das Auftreten eines unangenehmen Aromas bei Fleisch und Milch vermutet (Bhinu *et al.* 2009, Pearson *et al.* 1980, Ismail *et al.* 1981).

Eine Verringerung des Sinapin-Gehalts ist daher eine unabdingbare Voraussetzung für die Verwendung des Rapsmehles in der Tier- und Humanernährung. Umfangreiche Untersuchungen des Sinapingehaltes in verschiedenen *Brassica*-Arten zeigen eine erhebliche Variabilität dieses Merkmals (vgl. zum Felde 2007). Obwohl verfügbares *B. napus* Zuchtmaterial deutliche Unterschiede in der Sinapinkonzentration aufweist, war die Entwicklung neuen Zuchtmaterials mit hinreichend reduzierten Sinapingehalten durch die klassische Züchtung bislang wenig erfolgreich und zudem sehr zeitaufwändig (zum Felde 2007). In jüngerer Zeit wurden daher mehrere transgene Ansätze zur Reduzierung der Sinapinsäureester in der Rapssaat verfolgt, die vornehmlich auf eine Beeinflussung von Schlüsselenzymen der Sinapinbiosynthese abzielen (Hüsken *et al.* 2005, Bhinu *et al.* 2009, Clauß *et al.* 2008, 2011)

Die Biosynthese von Sinapin im reifendem Samen wird von zwei Schlüsselenzymen gesteuert, der *UDP-GLUCOSE:SINAPINSÄURE-GLUCOSYL-TRANSFERASE* (SGT) und der *SINAPOYLGLUCOSE:CHOLIN-SINAPOYLTRANSFERASE* (Sinapinsynthase; SCT). Das Enzym SGT transferiert in einem ersten Schritt ein Glucosemolekül an die Sinapinsäure und bildet so das Molekül 1-O-Sinapoylglucose. Von diesem Molekül ausgehend wird dann durch das Enzym SCT das Endprodukt Sinapin synthetisiert, indem die Glucose durch ein Cholinmolekül ersetzt wird. In diesem Zusammenhang muss noch ein weiteres wichtiges Enzym, welches eine Verbindung zwischen den Sinapinsäureestern in den Samen und den Keimlingen darstellt, erwähnt werden, nämlich die *SINAPIN ESTERASE* (SCE). Normalerweise wird dieses Enzym im keimenden Rapssamen exprimiert, um aus dem Sinapincholin dann wieder die Ausgangsformen Sinapinsäure und Cholin zu bilden. Dies ist notwendig, damit in den folgenden zwei Schritten über SGT und *SINAPOYLGLUCOSE L-*

*MALAT SINAPOYLTRANSFERASE* (SMT) das Sinapoylmalat entsteht, welches u.a. den Keimling vor UV-Strahlung schützt (Clauß *et al.* 2011).

Mit Hilfe von Untersuchungen an *Arabidopsis*-Mutanten und der Nutzung von Klonierungs-Strategien konnten die kodierenden Gene für die Enzyme SGT und SCT (Milkowski *et al.* 2000 a, b, 2004) sowie SCE identifiziert werden (vgl. Clauß *et al.* 2008). Ein viel versprechender Weg die Sinapingehalte maßgeblich zu reduzieren, ist die genetische Suppression von Schlüsselenzymen mittels RNAi-Methoden (RNA *interference*). So berichten Hüsken *et al.* (2005) von einer Suppression des Enzyms SGT im Sinapin-Syntheseweg bei Raps. Durch eine solche Unterdrückung der Genexpression war es möglich, den Gehalt an Sinapin bei transgenen Rapspflanzen um bis zu 70% im Vergleich zu herkömmlichen Rapsvarianten stabil zu verringern (Wolfram *et al.* 2010). In einer jüngeren Studie berichten Bhinu *et al.* (2009) von einer signifikanten Reduktion der Sinapinsäureestergehalte - bei gleichzeitiger Erhöhung der Sinapoylglucosegehalte - durch eine Suppression des SCT-Enzyms. Weitere Berichte zu verringerten Sinapingehalten in der Rapssaat zeigen, dass nicht nur eine Unterdrückung von Schlüsselenzymen der Sinapinbiosynthese erfolgreich sein kann, sondern vielmehr eine Überexpression von SCE im reifendem Samen eine bis zu 95%ige Reduktion des antinutritiven Sameninhaltsstoffes hervorrufen kann (Clauß *et al.* 2011). In der abschließenden Diskussion stellen die Forscher fest, dass eine dominante Vererbung für die SCE-Überexpression vorliegt und dass die besten Ergebnisse für reduzierte Sinapingehalte mit der Beeinflussung von Enzymen in späteren Schritten der Biosynthese erzielt werden (Clauß *et al.* 2011).

Unter den phenolischen Komponenten der Rapssaat stellen die schon angesprochenen Tannine (Proanthocyanidine) eine weitere wichtige Stoffgruppe mit antinutritivem Charakter dar. Tannine sind komplexe polyphenolische Komponenten, die für die dunkle Farbe der Rapssamen verantwortlich sind und überwiegend in den Vakuolen der Endothelzellen zwischen der Aleuronschicht und dem äußeren Integument der Samenschale gespeichert werden. Die in *Brassica spez.* gefundenen Samenschalenpigmente bestehen überwiegend aus oxidierten Proanthocyanidinen, bei denen Cyanindin-Derivate als Grundbausteine auftreten, und gehören zu den unlöslichen phenolischen Komponenten (Durkee *et al.* 1971, Naczki *et al.* 2000, Leung *et al.* 1979). Die berichteten und untersuchten Polyphenol-Gehalte in Samen und Mehl von der Rapssaat variieren stark und sind neben den unterschiedlichen Extraktionsmethoden auch von Umwelteinflüssen (Temperatur und UV-Strahlung) abhängig (vgl. Lipsa *et al.* 2012), wobei Naczki *et al.* (1998) einen Richtwert von etwa 2% kondensierten Tanninen in den Schalen annehmen. Die Fähigkeit der Tannine zur Bildung

von unlöslichen Komplexen mit Proteinen wird vornehmlich als die Hauptursache der antinutritiven Eigenschaften bei der Fütterung von Monogastern und auch Wiederkäuern mit tannin-reichen Futtermitteln gesehen (Naczk *et al.* 1994, Shahidi & Naczk 1992, Naczk *et al.* 1998).

Eine Reduktion dieser wertmindernden Substanzen ist durch die Selektion von hellsamigen Rapsgenotypen zu erreichen, denn für solche Genotypen ist eine Verringerung der Samenschalendicke beschrieben, die eine geringere Einlagerung von antinutritiven phenolischen Komponenten bedingt (Stringam *et al.* 1974). Untersuchungen zu Polyphenolen in verschiedenen *Brassica*-Arten mit unterschiedlichen Samenfarben zeigen eine Reduktion von Tanninen und anderen phenolischen Komponenten (z.B. Lignin) in gelb- bzw. hellsamigen Genotypen (Theander *et al.* 1977, Marles & Gruber 2004). Akhov *et al.* (2009) untersuchten speziell die Proanthocyanidin-Biosynthese bei einer hellsamigen *B. napus* Linie und zeigten, dass im Vergleich zu schwarzsamigen Genotypen verringerte Gehalte einer Reihe von phenolischen Komponenten zu finden sind. In diesem Zusammenhang weisen quantitativ-genetische Untersuchungen mittels QTL-Analyse (*quantitative trait loci*) zu kondensierten Tanninen in einer für Samenfarbe spaltenden *B. napus* DH-Population darauf hin, dass einerseits eine komplexe Vererbung für Tannine in Raps gegeben ist, und dass andererseits eine Assoziation mit der Samenfarbe zu erwarten ist (Lipsa *et al.* 2012).

Das Merkmal „Gelbsamigkeit“ entsteht nicht durch eine Einlagerung eines gelben Farbstoffes in der Samenschale, sondern vielmehr aufgrund des durchscheinenden Embryos durch eine transparente Samenschale. Im Hinblick auf die Pigmentierung der Samenschale sind für die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) eine Vielzahl von Mutanten beschrieben, die eine farblose Testa (*transparent testa*, *TT*) bzw. drastische Veränderungen im Phenylpropanoid-Stoffwechsel aufweisen (Kleindt *et al.* 2010, Lepiniec *et al.* 2006). Solche *Arabidopsis-TT*-Gene stellen aussichtsreiche Kandidatengene für das Merkmal „Gelbsamigkeit“ und relevante phenolische Inhaltsstoffe von Raps dar (Friedt *et al.* 2002).

In jüngeren Studien konnte gezeigt werden, dass einige *TT*-Gene im Rapsgenom hoch konserviert sind, wie z.B. *TT2* (Wei *et al.* 2007), *TT12* (Chai *et al.* 2009), *TT8*, *TT16* und *TTG1* (Nesi *et al.* 2009), und mit der Proanthocyanidin-Akkumulation in der Samenschale in Verbindung stehen. Darüber hinaus konnten Nesi *et al.* (2009) in Versuchen mit transgenem Raps zeigen, dass vor allem *TT2*, *TT8*, *TT16* und *TTG1* als Regulatoren für das *BANYLUS* (*BAN*) Gen, welches als eines der Schlüsselenzyme in der Proanthocyanidin-Biosynthese bekannt ist (Devic *et al.* 1999), fungieren und somit ein großes Potential für reduzierte Polyphenolgehalte darstellen. Neben den bereits genannten *TT*-Genen ist auch das *TT1* Gen

dafür bekannt, in die Regulierung der Samenschalenentwicklung einzugreifen. In Studien zur Vererbung von kondensierten Tanninen in Raps konnte eine Ko-Lokalisierung eines QTL für Tannin-Gehalt mit den genetischen Markern für *TT1* gefunden werden (Lipsa *et al.* 2012). In anderen Studien zur Genetik von Samenschalen-Merkmalen bei Raps ist eine Übereinstimmung zwischen den Genombereichen, die für die Ausprägung der Samenfarbe in Raps verantwortlich sind, mit vergleichbaren Genombereichen in *Arabidopsis* für verschiedene *TT*-Gene (Syntänie) gezeigt worden (Fu *et al.* 2007). Damit wird die vermutete Assoziation zwischen reduzierten Tanningehalten und einer hellen Samenfarbe unterstützt.

### 1.2.2 Verringerung und Analytik von Faserkomponenten in Raps

In vielen Studien wird jedoch vor allem der erhöhte Rohfaseranteil in Rapsmehl als der wichtigste wertmindernde Faktor gesehen (Schöne 1993, Kracht *et al.* 2004, Marles & Gruber 2004, Barth & Metges 2007, Slominski *et al.* 1999). Unter dem Begriff Rohfaser fasst man die verschiedenen pflanzlichen Zellwand- und Gerüstsubstanzen zusammen, die als eine stofflich sehr heterogene, chemisch-analytisch schwierig zu erfassende Fraktion zu sehen ist. Aufgrund einer verschlechterten Verdaulichkeit ist der Rohfasergehalt ein wichtiges Maß für die Bestimmung des ernährungsphysiologischen Wertes von Futtermitteln. Hohe Rohfasergehalte – insbesondere in Eiweißergänzungsfuttermitteln für die Monogasterfütterung (Schweine- und Geflügelmast) – werden kritisch betrachtet, da durch hohe Gehalte die Proteinverfügbarkeit deutlich reduziert ist und zu viele wertvolle Inhaltsstoffe der Futterration wieder unverdaut ausgeschieden werden (Schöne 1993). Die Rohfaser stellt keinen einheitlichen Inhaltsstoff dar, der über einen gemeinsamen Biosyntheseweg entsteht und ist daher allein durch die Analytik bestimmt. Lange Zeit war die Rohfaseranalytik auf die sogenannte Weender Futtermittelanalyse beschränkt, wonach die Rohfaser als unlöslicher fett-, stickstoff- und aschefreier Rückstand aufgefasst wird, der gleichzeitig den unverdaulichen Anteil in der Nahrung kennzeichnet (Henneberg & Strohmam 1859). Etwas unbefriedigend bei dieser Methode ist allerdings, dass das Lignin, welches neben den pflanzlichen Gerüstkohlenhydraten (Cellulose, Pentosane und andere Hemicellulosen) ebenfalls zu der Rohfaserfraktion zählt und als weitgehend unverdaulich gilt, zu einem nicht unerheblichen Teil bei der Analyse in Lösung gehen kann und nicht mit bestimmt wird.

Um dieser Problematik zu begegnen und den unverdaulichen Teil, hauptsächlich den Lignin-Anteil, der Nahrung exakter erfassen zu können, entwickelte Van Soest (1964) chemisch besser definiertere Verfahren. Diese neu entwickelten Futtermittelanalysen basieren auf einer

fraktionierten Extraktion mit Detergentien (Säuren und Laugen). Zu nennen sind hier die NDF-Methode (*neutral detergent fibre*), die ADF-Methode (*acid detergent fibre*) und die ADL-Methode (*acid detergent lignin*). Die verschiedenen Methoden dienen der Beschreibung der Zellwandgerüstsubstanzen, so werden unter dem NDF-Gehalt die Anteile von Hemicellulose, Cellulose und Lignin zusammengefasst. Bei der ADF-Methode werden durch die Behandlung mit einer schwefelsauren Detergentienlösung die Komponenten Cellulose und Lignin nicht aus dem Futtermittel herausgelöst. Der ADL-Gehalt beschreibt den Gehalt der unverdaulichen Gerüstsubstanz Lignin und wird durch eine fortführende Behandlung des Rückstandes der ADF-Methode mit 72%iger Schwefelsäure bestimmt.

Die Zellwandgerüstsubstanz Lignin ist ebenfalls eine stark wertmindernde Komponente aus der Gruppe der phenolischen Verbindungen und stellt ein Mischpolymer aus Phenylpropanen, wie z.B. Zimtsäure-Alkoholen (Coniferyl-, Cumaryl- und Sinapylalkohol), dar. Die genannten Phenylpropane sind Sekundärmetabolite und werden als Monolignole bezeichnet, die sich zu einem dreidimensionalen Gitter vernetzen und so die Zellwand durchdringen. Sie leiten sich, ähnlich wie die bereits besprochenen Sinapine und kondensierten Tannine aus dem Phenylpropanoid-Syntheseweg ab. Aus Coniferyl-, Cumaryl- und Sinapyl-Alkohol werden Guaiacyl (G), Hydroxyphenyl (H) bzw. Syringil (S)-Einheiten gebildet, die durch oxidative Polymerisation miteinander verknüpft werden und somit das komplexe aromatische Polymer Lignin entstehen lassen (Dixon *et al.* 2001).

Die Lignin-Zusammensetzung aus den genannten Monomer-Einheiten (G, H, S) kann variieren und ist vom Entwicklungsgrad der Pflanzen sowie der Umwelt abhängig (Boerjan *et al.* 2003). Beispielsweise ist das Lignin der dicotylen Angiospermen aus den Einheiten G und S mit kleinen Spuren der Einheit H zusammengesetzt, hingegen ist bei den eikeimblättrigen Angiospermen eine Lignin-Zusammensetzung aus gleichen Teilen der Einheiten G und S und einem größeren Anteil an Hydroxyphenyl zu beobachten (Boerjan *et al.* 2003). In Futterpflanzen, z.B. Leguminosen und Gräsern, steigt der Lignin-Gehalt mit fortschreitender Alterung bzw. Abreife, und erhöhte Anteile der Guaiacyl- und Syringil-Einheiten können bei zunehmendem Reifegrad beobachtet werden. Beides, Lignin-Konzentration und erhöhte Gehalte der Monomere G und S, sind negativ mit der Verdaulichkeit der Futterpflanzen korreliert (Dixon *et al.* 2001).

Innerhalb der Zellwände findet man die höchsten Lignin-Konzentrationen in den Bereichen der Zellecken und in der Sekundärwand, wobei das Maximum der Ligninproduktion und Lignineinlagerung nach abgeschlossener Einlagerung der Zellwand-Kohlenhydrate Cellulose und Hemicellulose erreicht wird (Boerjan *et al.* 2003). Vor allem in Bereichen der



Pflanzenoberfläche, der Samenschale und der Gefäße sind lignifizierte (verholzte) Zellen zu finden. Eine Verholzung der Zellwand erhöht die mechanische Festigkeit gegenüber Druckbelastung und Beschädigungen (Kuras *et al.* 1999). Ferner wird durch die Inkrustierung mit Lignin eine herabgesetzte Wasserwegsamkeit der Zellwand beobachtet, die wegen einer chemischen Verbindung mit Hemicellulose mit gleichzeitigem Wasserentzug zu einem hydrophoben Charakter führt (Boerjan *et al.* 2003). Mitunter wird dem Lignin auch eine entscheidende Rolle bei der Resistenz gegenüber Pathogenbefall, wie z.B. gegenüber *Verticillium longisporum* bei Raps, zugesprochen (Eynck *et al.* 2009).

Studien in verschiedenen *Brassica*-Arten zeigen, dass Lignin und verwandte phenolische Substanzen innerhalb des Samens hauptsächlich in der Samenschale lokalisiert sind (Marles & Gruber 2004). Diese Ergebnisse und die bekannte biochemische Verknüpfung von Lignin mit anderen Samenschalen-Merkmalen (Pigmentierung, Tanninakkumulation) über den Phenylpropanoid-Stoffwechsel unterstützt wiederum die Selektion von hellsamigen Rapsgenotypen, um die Qualität von Rapsschrotprodukten deutlich zu verbessern (Friedt *et al.* 2002). Erste Berichte über verringerte Samenfasergehalte in hellsamiger Rapssaat wurden von Stringam *et al.* (1974) vorgestellt, die einen um die Hälfte verringerten Fasergehalt bei gelbsamigen Genotypen beobachteten, was zudem gleichzeitig in einer Erhöhung der beiden wertgebenden Sameninhaltsstoffe Öl und Protein resultierte. Eine verbesserte biologische Wertigkeit von Rapsmehlprodukten aus hellsamigen *Brassica*-Arten mit gesteigertem Proteingehalt und reduziertem Lignin-Gehalt werden durch vergleichende Futtermittelanalysen mit schwarzsamigen Rapsmaterial bestätigt (Slominski *et al.* 1994, 1999, Simbaya *et al.* 1995).

Eine genetische Assoziation des Merkmals Samenfarbe mit Samen-Fasergehalten wird durch QTL-Analysen an zwei für Samenfarbe spaltenden Winterraps DH-Populationen deutlich (Badani *et al.* 2006). Neben einer starken positiven Korrelation zwischen ADF-Gehalt und Samenfarbe identifizieren Badani *et al.* (2006) erstmals gemeinsame Genombereiche auf denen sowohl QTL für den ADF-Gehalt als auch für die Samenfarbe lokalisiert sind. Die Verringerung der Fasergehalte in den Samen wird auf eine reduzierte Samenschalendicke zurückgeführt, denn durch die Verringerung des Samenschalenanteils kann in den Zellwänden der meist kleineren Zellen weniger Lignin und andere Fasersubstanzen eingelagert werden. Eine Verbindung zwischen verminderten Samenschalenanteilen und der Samenfarbe sowie dem Samenölgehalt werden durch quantitativ-genetische Studien an *B. napus* bestätigt. So zeigten Yan *et al.* (2009) eine Ko-Lokalisierung von QTL für Samenfarbe,

Samenschalenanteil und Ölgehalt und schlagen eine gemeinsame Selektion dieser drei Merkmale für eine Verbesserung der inneren Samenqualität von Raps vor.

Die vermutete gemeinsame Vererbung von Samenfarbe, kondensierten Tanninen und Lignin in Körnerölraps wird durch die Ergebnisse von Fu *et al.* (2007) unterstützt. Die Forschergruppe hat in genetischen Untersuchungen an Rekombinanten Inzuchtlinien (RIL) einen QTL für Samenfarbe identifiziert, dessen Genombereich in Raps mit dem Genombereich für das Gen *TT10* in *Arabidopsis* korrespondiert. Das *TT10* Gen ist aus *Arabidopsis* bekannt und beschreibt eine Laccase (*AtLAC15*), die zum einem bei der Polymerisierung und Oxidation von Proanthocyanindinen beteiligt ist (Pourcel *et al.* 2005) und zum anderen bei der Polymerisation von Ligninmonomeren mitwirkt (Liang *et al.* 2006).

Letztendlich geben diese Studien noch keinen endgültigen Beweis für eine gemeinsame Vererbung von wichtigen Samenschalen-Merkmalen, lassen aber weiterhin die Hypothese bestehen, dass die phenolischen Komponenten – inklusive der Faserkomponente Lignin – miteinander in Verbindung stehen. Es ist daher notwendig weitreichendere Kenntnisse über die genetischen Hintergründe der einzelnen Samenschale-Komponenten zu erlangen. Hierbei können neueste Ergebnisse aus unserer Arbeitsgruppe zur genetischen Determination des ADL-Gehaltes in Raps ggf. wertvolle Informationen liefern. In für Samenfarbe spaltenden RILs aus einer Kreuzung zwischen einer gelbsamigen chinesischen Rapslinie und einem schwarzamigen Rapsgenotyp wurde die Genomregion, die den größten Anteil der phänotypischen Varianz für die Samenfarbe und den ADL-Gehalt erklärt, durch Zuhilfenahme von genomischen Sequenzdaten aus *B. rapa*, näher untersucht. Mittels einer Feinkartierung in einer Rückkreuzungspopulation bestehend aus 872 BC1F2 Pflanzen wurde zunächst ein dominanter Erbgang mit einer 3:1 Spaltung für einen niedrigen ADL-Gehalt in den Rapssamen beobachtet. Diese Spaltungsrate lässt auf eine digenische Vererbung des Merkmals schließen. In der weiterführenden genetischen Analyse wurde in der gelbsamigen Rapslinie eine *loss-of-function* Mutation in einem Schlüsselenzym der Ligninbiosynthese, der *CINNAMOYL CoA REDUCTASE (CCR)*, gefunden (Liu *et al.* 2012). Es liegt daher die Vermutung nahe, dass der Zusammenhang zwischen reduzierten Fasergehalten und geringer Akkumulation von Proanthocyanidinen in der Samenschale durch einen pleiotropen Effekt aufgrund einer dünneren Samenschale zu erklären ist.

Die herkömmliche nasschemische Bestimmung der Rohfaserfraktion ist destruktiv. In der Pflanzenzüchtung ist dies unerwünscht, da in den meisten Fällen nicht genügend Samen zur Verfügung stehen, um eine Analyse bei gleichzeitiger Erhaltung einer breiten genetischen Variation durchzuführen. Die Analyse nach der Standardmethode ist zudem sehr zeit- und

kostenintensiv. Für die Züchtung ist daher eine Selektionsmethode auf das Merkmal Rohfaser wünschenswert, die zum einen zerstörungsfrei und zum anderen mit einem geringen Zeit- und Kostenaufwand funktioniert. In jüngerer Zeit wurde von einer Rohfaser-Schnellbestimmung bei verschiedenen *Brassica*-Arten mit Hilfe der Nahinfrarot-Reflektionsspektroskopie (NIRS) basierend auf ADF-Werten berichtet (Font *et al.* 2003, Font *et al.* 2005).

### 1.3 Züchtung und genetische Determination des Merkmals „Gelbsamigkeit“

Es konnte wiederholt gezeigt werden, dass in *Brassica*-Arten mit dem Merkmal „Gelbsamigkeit“ und den damit verbundenen dünneren Samenschalen ein reduzierter Rohfasergehalt mit gleichzeitig erhöhten Anteilen an wertbestimmenden Sameninhaltsstoffen wie Öl und Protein einhergeht (Stringam *et al.* 1974, Shirzadegan & Röbbelen 1985, Bechyne 1987, Downey & Bell 1990, Thies 1994).

In der Rapszüchtung wird daher der Selektion von hellsamigen Rapsgenotypen eine große Bedeutung beigemessen, um den Gehalt an unverdaulichen Substanzen zu reduzieren, wodurch die Verdaulichkeit von Rapsschrot insgesamt verbessert werden kann. Neben der damit gesteigerten inneren Samenqualität können ebenfalls verbesserte Schrotqualitäten erzielt werden, was einen verstärkten Einsatz von Rapsschrot in der Tierernährung ermöglichen kann (vgl. Friedt *et al.* 2002, Rahman & McVetty 2011). Die Zusammenhänge zwischen der Hellsamigkeit, dem Gehalt an Rohfaser und anderen antinutritiven Sameninhaltsstoffen sowie einer verbesserten Verdaulichkeit sind in der vorliegenden Arbeit eingehend diskutiert worden.

In Zuchtgartenmaterial konnten Raps-Mutanten mit hellen Samen schon oft selektiert werden, deren Merkmalsstabilität sich jedoch als unzureichend erwies (Wang & Liu 1991, Rahman & McVetty 2011). Die erste hellsamige Rapsorte ‚Hua-yellow No.1‘ wurde in China nach Einkreuzung gelbsamiger *B.rapa*-Formen in Rapsmaterial und anschließender mehrjähriger Selektion entwickelt (vgl. Rahman & McVetty 2011). Es ist somit nicht verwunderlich, dass auch die erste gelbsamige Raps-Hybride ‚Yuhuang 1‘ im Jahr 2001 in China zugelassen wurde (Chen *et al.* 2002). Eine Zulassung von weiteren gelbsamigen Rapsformen in Deutschland, Europa oder weltweit ist bisher nicht bekannt. Ein Grund dafür liegt in der unbefriedigenden Umweltstabilität des Merkmals, denn Vererbungsstudien zur Samenfarbe von Shirzadegan (1986) und Van Deynze *et al.* (1993) haben gezeigt, dass die Ausprägung der Samenfarbe einer starken Umweltmodifikation unterliegt und somit grundlegende Schwierigkeiten für die Züchtung stabiler gelbsamiger Rapsformen aufwirft.

Bei Raps (*B. napus* L.,  $2n=38$ , AACC) handelt es sich um eine amphidiploide Pflanze, die durch eine Artkreuzung aus Rübsen (*B. rapa*  $2n=20$ , AA) und Kohl (*B. oleracea*,  $2n=18$ , CC) entstanden ist (vgl. U 1935). Das bedeutet, dass die meisten Merkmale durch wenigstens zwei Sets von Genen bestimmt sind, einerseits vom A-Genom des Rübsens und andererseits vom C-Genom des Kohls. Es ist deswegen anzunehmen, dass auch die Samenfarbe durch homologe Loci in den zwei Genomen bestimmt wird. Um nun genetisch stabile hellsamige Rapsgenotypen zu erhalten, die unter natürlichen Bedingungen nur selten vorkommen, sollten die relevanten Gene von beiden Genomen, also A und C, in Raps eingebracht werden (Rashid *et al.* 1994, Meng *et al.* 1998). Die direkte und indirekte Nutzung von interspezifischen Kreuzungen mit anderen *Brassica*-Arten stellen daher eine vielversprechende Alternative dar, um das Merkmal „Gelbsamigkeit“ in Raps zu etablieren. Die Entwicklung von gelbsamigen Rapsgenotypen durch eine Kreuzung zwischen der schwarzsamigen Rapssorte ‚Quinta‘ und einer Raps-Resynthese, die auf eine Kreuzung zwischen einer hell- bzw. braunsamigen *B. alboglabra* (CC)-Akzession mit einer gelbsamigen *B. rapa* (AA) Linie zurückgeht, zeigen die Möglichkeit der direkten Nutzung von A- und C-Genom-Arten für die Züchtung auf das Ziel-Merkmal (Shirzadegan & Röbbelen 1985). In diesem Zusammenhang muss aber darauf hingewiesen werden, dass in den meisten Fällen nur wenige natürliche C-Genom-Arten mit einer hellen Samenschale vorkommen (vgl. Friedt *et al.* 2002).

Deswegen wird neben den C-Genom-Arten auch der Verwendung der tetraploiden Spezies, wie beispielsweise *B. carinata* (BBCC), das Potential zugesprochen, die Gene für die Gelbsamigkeit aus dem C-Genom einzubringen (vgl. Rahman & McVetty 2011). In der Literatur werden daher verschiedene Ansätze zur Nutzung von *B. carinata* als Donor für die Samenfarbe bestimmenden Gene aus dem C-Genom diskutiert: Zaman (1987) erzeugte gelbsamige Rapslinien durch eine Kreuzung zwischen gelbsamigen *B. carinata* und *B. rapa*-Akzessionen und anschließende Rückkreuzungen mit *B. napus*; Rashid *et al.* (1994) führten interspezifische Kreuzungen von *B. napus* mit gelbsamigen Formen der Senfarten *B. juncea* (AABB) und *B. carinata* durch; Qi *et al.* (1995) nutzten direkt Kreuzungen zwischen *B. carinata* mit *B. napus* zur Entwicklung gelbsamiger Linien; Meng *et al.* (1998) erhofften sich aus der interspezifischen Kreuzung zwischen *B. rapa* bzw. *B. carinata* mit *B. napus* eine Entwicklung stabiler gelbsamiger Rapsformen und zuletzt berichtete Rahman *et al.* (2001) von der Erzeugung stabiler gelbsamiger *B. napus* Linien durch die Nutzung von interspezifischen Kreuzungen zwischen *B. carinata* und *B. rapa* und anschließende Rückkreuzungen mit Raps und darüber hinaus von der Entwicklung einer stabilen gelbsamigen diploiden *B. alboglabra* (CC) Linie.

In den meisten Kreuzungsversuchen erhielt man nur teilweise gelbsamigen Raps, denn wegen der vorwiegend maternalen und multigenen Vererbung des Merkmales Samenfarbe ist die Einkreuzung von Samenfarbe bestimmenden Genen aus anderen *Brassica*-Arten in Raps oft schwierig, denn nur reinerbig „gelbe“ Linien erzeugen auch gelbe Samen, und mischerbige Genotypen spalten in den Folgegeneration auf (Shirzadegan 1986, Henderson & Pauls 1992, Heenen & Brismar 2001). In Abhängigkeit von der verwendeten Quelle für das Merkmal „Gelbsamigkeit“ kann eine komplexe Vererbung (trihybrider Erbgang) postuliert werden. Gelbe Samen entstehen folglich nur unter der Voraussetzung, dass an allen drei Genloci der homozygot-rezessive Status vorliegt (*bl1bl1*, *bl2bl2*, *bl3bl3*) (Shirzadegan 1986, Henderson & Pauls 1992, Van Deynze & Pauls 1994b, Van Deynze *et al.* 1995, Baetzel *et al.* 1999, Lühs *et al.* 2000, Rahman *et al.* 2001). In heterozygoten Genotypen ist die Merkmalsausprägung zudem in starkem Maße von der Umwelt, wie Temperatur- und Abreifebedingungen, beeinflusst (vgl. Van Deynze *et al.* 1993).

Schwarzsamigkeit ist demnach dominant über Gelbsamigkeit, es muss jedoch beachtet werden, dass unterschiedliche Aussagen über die Dominanzeffekte in den verschiedenen Vererbungsstudien getroffen werden. In der Studie von Shirzadegan (1986) erkennt man eine unvollständige Dominanz für Dunkelsamigkeit. Das bedeutet, dass bei dominanter Homozygotie am ersten Locus für das Schwarzsamigkeits-Allel (*Bl1Bl1*) schwarze Samen vorliegen. Eine breite Variation verschiedener Brauntöne (gelbbraun bis schwarzbraun) mit unterschiedlich stark ausgeprägter Musterung (Scheckigkeit) zeigt sich, wenn nur an den anderen beiden Loci der dominante Allelzustand für Schwarzsamigkeit vorliegt. Die Studie von Van Deynze & Pauls (1994) zeigt, dass vollständig schwarze Samen nur dann gebildet werden, wenn der dominante Allelzustand am ersten Locus vorliegt und zusätzlich mindestens ein dominantes Allel an einem der weiteren Loci zu finden ist. Dementgegen beschreiben Baetzel *et al.* (1999), dass schwarze Samen nur dann auftreten, wenn an allen drei Genorten der homozygot-dominante Zustand vorliegt. In einer jüngeren Studie wird von der Identifizierung von zwei unabhängig agierenden dominanten Genen für die Ausprägung der schwarzen Samenfarbe bei *B. napus* berichtet, wobei noch ein drittes Gen identifiziert wurde, welches für eine helldunkle Samenschalenfarbe verantwortlich ist (Rahman *et al.* 2010). Die Dominanz-Grade werden wie folgt beschrieben: die beiden Gene für dunkle Samenschale sind vollständig dominant über die helldunkle Samenfarbe und über die Gelbsamigkeit; das dritte Gen für helldunkle Samenfärbung zeigt nur eine unvollständige Dominanz über die Allele für Gelbsamigkeit. Diese teilweise auftretenden Dominanzeffekte sind für *B. rapa* var. „Yellow

sarson‘ beschrieben aber aufgrund der starken Umweltmodifikation für Samenfarbe bei *B. napus* schwierig zu erfassen (vgl. Rahman & McVetty 2011).

Entgegen der generellen Annahme einer Dominanz der Schwarzsamigkeit wird in jüngerer Zeit auch über eine dominante Vererbung des Merkmals „Gelbsamigkeit“ berichtet. So lokalisierte Somers *et al.* (2001) ein einzelnes Major-Gen, welches 72% der Varianz für die Samenfarbe in einer Kreuzung zwischen schwarz- und gelbsamigen *B. napus*-Formen erklärt. Die Autoren folgern, dass das gefundene Major-Gen für Hellsamigkeit dominant ist. Unterstützt wird diese Aussage von Liu *et al.* (2005): diese Arbeitsgruppe berichtet ebenfalls von einem dominanten trigenischen Vererbungsmodell für gelbe Samenfarbe in einer Kreuzung zwischen einem schwarzsamigen Raps mit einer resynthetisierten gelbsamigen Rapsform. Es wird von einem partiell dominanten Gen für das Merkmal „Gelbsamigkeit“ berichtet, welches epistatisch über zwei Gene für Schwarzsamigkeit wirkt. Auch Badani *et al.* (2006) beobachteten eine dominante Vererbung der Hellsamigkeit bei verschiedenen für Samenfarbe spaltenden Winterrapspopulationen. Diese ersten Berichte über Dominanz der Hellsamigkeit werden von weiteren genetischen Untersuchungen der Samenfarbe bei Raps mittels QTL-Analysen an der Nachkommenschaft von verschiedenfarbigen *B. napus* Elternlinien bestätigt. In den meisten Fällen wird ein Haupt-QTL für Samenfarbe mit großem Einfluss auf die phänotypische Varianz für das Merkmal „Samenfarbe“ auf dem Chromosom A9 lokalisiert. Neben dem Haupt-QTL berichten die meisten Forschergruppen aber auch von weiteren QTL auf anderen Chromosomen, die jedoch einen geringen Effekt auf die Ausprägung der Samenfarbe in Raps haben und unterstützen so die komplexe Vererbung der Samenfarbe (Liu *et al.* 2006, 2012, Fu *et al.* 2007, Lipsa *et al.* 2012).

#### **1.4 Einsatz der Nahinfrarot-Reflektionsspektroskopie (NIRS) in der Rapszüchtung**

In der Winterrapszüchtung war eine allumfassende Qualitätsanalytik für die relevanten Sameninhaltstoffe wegen der beteiligten, stark heterogenen Stoffgruppen in der Vergangenheit kaum möglich und – wenn überhaupt - nur in separaten Analysen durchführbar. Zudem ist aufgrund der langen Vegetationsperiode und des für die Analysen verfügbaren kurzen Zeitraums zwischen Ernte und Wiederaussaat (4-6 Wochen) die analytische Erfassung aller relevanten Sameninhaltstoffe bei umfangreichem Zuchtmaterial oft nicht durchführbar. Seit jüngerer Zeit stehen für die Züchtungsforschung und Qualitätszüchtung neue Analyseverfahren für eine Schnellbestimmung verschiedener Qualitätsparameter in einem einzigen Durchgang zur Verfügung. Diese Analysen beruhen

zumeist auf der Nahinfrarot-Reflektionsspektroskopie (NIRS), die zerstörungsfrei arbeitet und eine sehr gute Schätzung verschiedener wertvoller und wertmindernder Sameninhaltsstoffe ermöglicht (Tkachuk 1981, Bengtsson 1985, Koester 1989, Font *et al.* 2006).

Die NIRS Analytik beruht auf der Absorption und Reflektion, je nach chemischer Zusammensetzung, bei einer Bestrahlung der zu untersuchenden Probe mit Nahinfrarotlicht des Wellenlängenbereiches 800-2500 nm. Die Absorption beschreibt die Schwächung eines Teilchenstroms oder der Energie wegen Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie. Zur diffusen Reflektion kommt es, wenn die Strahlung eine Eigenschwingung der Analytmoleküle anregt und dann in alle Richtungen gestreut wird. Reflektiert wird aber nur der Anteil an Strahlung, der nicht durch die Analytmoleküle absorbiert wird. Wichtige Absorber sind Moleküle, die O-H-, C-H-, N-H- und C-O-Bindungen enthalten (Rotollo 1979). Gemessen wird die Reflektion in Abhängigkeit von der Wellenlänge im Bereich des Lichts im Nahinfrarotbereich. Die Intensität der Reflektion hängt von dem Anteil absorbierender Moleküle in einer Probe ab. Denn je mehr solcher Moleküle vorhanden sind, desto geringer ist die Reflektion. Folglich kann aus der Intensität auf die Quantität dieser Inhaltstoffe geschlossen werden.

Zu Beginn der Nutzung von NIRS-Systemen als analytisches Instrument in der Rapszüchtung standen zunächst die wertgebenden Sameninhaltsstoffe (Öl und Protein) und die Glucosinolate (GSL) im Vordergrund bei der Entwicklung von brauchbaren NIRS-Kalibrationen. Heutzutage finden in der praktischen Rapszüchtung daher Kalibrationen für Öl-, Protein- und GSL-Gehalt sowie diverse Fettsäure-Anteile ihren Einsatz (Tillmann 1997a, b, Font *et al.* 2006) und werden gleichermaßen von Rapsforschern und Rapszüchtern verwendet.

Es bestehen aber aktuelle Bestrebungen neben den bereits verfügbaren NIRS-Kalibrationen für wertgebende Inhaltstoffe auch neue Kalibrationen für die im Verlauf der Arbeit genauer beschriebenen antinutritiven Sameninhaltsstoffe, wie die Faserkomponenten, Tannine und Sinapin, zu erstellen. In der Literatur sind bereits verschiedene Ansätze zur Entwicklung von neuen NIRS-Kalibrationen für Sinapine in Raps (Velasco *et al.* 1998, zum Felde 2007) und ADF (*acid detergent fibre*) bei verschiedenen *Brassica*-Arten und Raps (Font *et al.* 2003, Font *et al.* 2005) beschrieben. Die erstellten Kalibrationen finden bislang noch keinen breiten Einsatz in der praktischen Züchtung, können aber durchaus für die Untersuchung der phänotypischen bzw. genetischen Variation der verschiedenen Merkmale herangezogen werden.

---

Dennoch ist zukünftig die Entwicklung neuer NIRS-Kalibrationen für eine breite Erfassung aller relevanten Sameninhaltsstoffe unter spezieller Betrachtung der Faser- und Glucosinolatgehalte, der Aminosäurezusammensetzung, der Fettsäurezusammensetzung, des Sinapins und der Tannine für eine vereinfachte, zerstörungsfreie und effektive Selektion verbesserter Rapsgenotypen im Hochdurchsatzverfahren unerlässlich. Denn allein die Beachtung möglichst vieler wertvoller und antinutritiver Sameninhaltsstoffe in der Qualitätsanalytik und deren direkte Umsetzung in der Selektion verbesserter Genotypen wird längerfristig eine umfassende Verbesserung des Futterwertes von Rapsschrot ermöglichen.



## 2 ZIELSETZUNG

In der praktischen Rapszüchtung spielt die Qualität des Rapsschrotes, als Rückstand der Ölextraktion, eine zunehmend wichtigere Rolle für eine weitere Steigerung der Verwendungsmöglichkeiten von Körnerölraps. In diesem Zusammenhang ist es in der Pflanzenzüchtung notwendig, Hochdurchsatz-Analysemethoden für die Erfassung möglichst vieler relevanter und antinutritiver Sameninhaltsstoffe, wie z.B. Rohfaser, zu nutzen, um neue Rapsgenotypen mit verbesserter Schrotqualität zu selektieren. Ziel der Arbeit war daher die Entwicklung von Kalibrationen für die Nahinfrarot-Reflektionsspektroskopie (NIRS) der Faserfraktionen NDF (*neutral detergent fibre*), ADF (*acid detergent fibre*) und ADL (*acid detergent lignin*) in intakten *B. napus* Samen. Die Entwicklung von NIRS-Kalibrationen für verschiedene Samenvolumina wurde durchgeführt, um Analysemethoden sowohl für junge als auch für fortgeschrittene Zuchtgenerationen bereitzustellen. Notwendige Grundlage für die Entwicklung solcher NIRS-Kalibrationen ist eine verlässliche Referenzanalytik. Die Etablierung einer Analytik für NDF, ADF und ADL war daher ein wesentlicher Bestandteil der Forschungsarbeiten.

Neben der Nutzung neu entwickelter Analysemethoden als Selektionswerkzeug in der Pflanzenzüchtung ist auch die Verwendung der NIRS-Kalibrationen für das Screening großer Pflanzenpopulationen in genetischen Studien möglich, um nähere Informationen über die Vererbung der Faserkomponenten in Rapssamen zu erhalten. Mit dem Einsatz der neu entwickelten NIRS-Kalibration für die Untersuchungen von Rapsgenotypen verschiedenster Herkunft aus mehrjährigen und mehrortigen Feldversuchen konnten Berechnungen der Erbllichkeit (Heritabilität;  $h^2$ ) sowie von Korrelationen mit anderen Sameninhaltsstoffen durchgeführt werden. Weiterhin waren die ermittelten phänotypischen Daten notwendige Grundlage für molekular-genetische Untersuchungen zur Identifizierung von Kandidatengenen und genetischen Assoziationen mit anderen Samenschalenmerkmalen.

Darüber hinaus wurde die Zusammensetzung von phenolischen Komponenten, insbesondere von phenolischen Säuren und kondensierten Tanninen, in den Samen von unterschiedlichem Winterrapsmaterial analysiert, um kausale Zusammenhänge zwischen den einzelnen Samenschalenmerkmalen aufzudecken.

Begleitend zu der analytischen Erfassung der Samenschalenkomponenten wurden in Feldversuchen anhand von Kreuzungspopulationen und selektierten Nachkommenschaften mittels der neu gewonnenen Qualitätsdaten neue Genotypen mit verbesserter Schrotqualität erstellt.

---

### 3 PUBLIKATIONEN

#### 3.1 Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe

Benjamin Wittkop, Rod J. Snowdon, and Wolfgang Friedt

*Euphytica* **2009**, 170, 131-140.

# Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe

B. Wittkop · R. J. Snowdon · W. Friedt

Received: 2 February 2009 / Accepted: 15 April 2009 / Published online: 30 April 2009  
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

**Abstract** Vegetable oils are a high-value agricultural commodity for use in refined edible oil products and as renewable industrial or fuel oils, and as the world population increases demand for high-quality seed oils continues to grow. Worldwide the oilseed market is dominated by soybean (*Glycine max*), followed by oilseed rape/canola (*Brassica napus*). In Europe the major oilseed crop is oilseed rape (*B. napus*), followed some way behind by sunflower (*Helianthus annuus*) and other minor crops like linseed (*Linum usitatissimum*) or camelina (*Camelina sativa*). The seed oil of these crops is characterized by a specific quality, i.e. fatty acid composition and other fat-soluble compounds: Camelina and linseed oils are characterised by high contents of linolenic acid (C18:3); in sunflower very high-oleic (up to 90% C18:1) types exist in addition to classical high-linoleic (C18:2) oilseeds; in *B. napus* a broad diversity of oil-types is available in addition to the modern 00 (canola) type, e.g. high-erucic acid rapeseed or high-oleic and low-linolenic cultivars. Moreover, vegetable oils contain valuable minor compounds such as tocopherols (vitamin E). Increases of such contents by breeding have lead to value-added edible oils.

After oil extraction, oilseed meals—such as rapeseed extraction meal—contain a high-quality protein that can be used as a valuable animal feed. However, in comparison to soybean the meal from oilseed rape also contains relatively high amounts of anti-nutritive fibre compounds, phenolic acids, phytate and glucosinolates. Breeding efforts with respect to meal quality are therefore aimed at reduction of anti-nutritive components, while increasing the oil content, quality and yield also remains a major aim in oilseed rape breeding. This review article provides a general overview of the status of oilseed production in Europe and uses examples from winter oilseed rape to illustrate key breeding aims for sustainable and high-yielding production of high-quality vegetable oil. Emphasis is placed on analytical tools for high-throughput selection of overall seed quality.

**Keywords** Oilseed crops · Camelina · Linseed · Sunflower · Rapeseed · *Brassica napus* · Seed oil quality · Extraction meal quality · Nutritive compounds · Antinutritive substances · High-throughput selection · NIRS

## Introduction

Oilseed crops are highly valuable basic agricultural trade materials, and as the world population expands and fossil resources decline the demand for refined edible oil products and renewable industrial oils

---

B. Wittkop · R. J. Snowdon · W. Friedt (✉)  
Department of Plant Breeding, Research Centre for  
Biosystems, Land Use and Nutrition, Justus Liebig  
University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen,  
Germany  
e-mail: Wolfgang.Friedt@agrar.uni-giessen.de

continues to grow. Presently the international oilseed market is dominated by soybean (*Glycine max*), oilseed rape/canola (*Brassica napus*) and sunflower (*Helianthus annuus*). However, with increasing production areas the pressure on crop rotations in terms of sustainable production has increased the requirement for greater diversification of crop plants including oilseeds. Of growing interest in this respect are alternative crops that combine positive agronomical properties, for example nutrient efficiency, pathogen tolerance and a short growing season, with a diverse food and non-food application of the seed oil. Examples of such alternative crops are linseed (oil flax) and the crucifer oilseed camelina (false flax). Besides their specific requirements regarding climate, soil and cultivation practices, it is mainly the crop stability, yield potential and quality of the product that determine the cultivation and use of the different oil crops. The major oilseed species, and their individual types, show a broad variation in the composition and range of seed oil fatty acids (Table 1).

### Current production of oilseed crops

Soybean, the world's dominating oilseed crop, is a self-pollinating plant (inbreeder) where cultivars represent pure lines. Today soybeans are grown on a global area of around 95 million hectares (M ha) to produce over 200 million tonnes (M t) of seed. Although soybean originated in Eastern Asia, it is today mainly produced in America. In the European Union (EU), soybean is a relatively minor summer-annual crop, with a total production area of only around 0.4 M ha and 0.8 M t of seed produced (FAOSTAT 2007, <http://faostat.fao.org>).

The predominant oil crop in Europe is oilseed rape, a member of the mustard family (*Brassicaceae*), which is widely grown as a winter crop on a current total area of 8.2 M ha. To date most oilseed rape is produced within the EU member countries (currently 6.5 M ha, with 18.3 M t seed). However, great potential is seen for increasing production in Eastern Europe. The world's total acreage of *B. napus* oilseed rape/canola along with related oilseed brassicas (e.g. mustards) is about 30.2 M ha, with a current production of around 50 M t. The major growing countries are China (7.1 M ha in 2007), India (6.6 M ha, mainly mustard), Canada (5.8 M ha), France (1.6 M ha),

Germany (1.5 M ha) and Australia (1.1 M ha). Other countries with significant production levels up to 1 M ha are Ukraine, Poland, the United Kingdom, Russia, the USA and Pakistan (FAOSTAT 2007, <http://faostat.fao.org>). As a facultative outbreeder, oilseed rape varieties can either be open pollinated (OP) or hybrid types. In all major growing areas, including Europe, an increasing proportion of the registered varieties represent single-cross hybrids.

The second-ranked oilseed crop in Europe is sunflower, a typical spring-sown crop. Sunflower is an outbreeder and the production is based exclusively on single-cross hybrid cultivars. Currently sunflower is grown on a worldwide acreage of 22 M ha, of which more than half is contributed by Europe. Besides the EU, with an annual production of 4.8 M t seed on 6.5 M ha in 2007, other major producers are Russia (5.0 M ha), Ukraine (3.4 M ha), Argentina (2.4 M ha), India (2.4 M ha) and China (1.0 M ha; FAOSTAT 2007, <http://faostat.fao.org>).

Production of the self-pollinating summer annual crop linseed (oil flax, *Linum usitatissimum*) is of some importance in certain regions (e.g. Western Canada) for particular food or non-food purposes. The current worldwide acreage is only 2.2 M ha, whereby the EU member countries grew only 135,000 ha of flax in 2007 and contributed <10% of the total production of 1.9 M t seed (FAOSTAT 2007, <http://faostat.fao.org>). Linseeds have a high 1,000-seed weight of 5–8 g, but a comparatively low oil content of only 36–40% (Diederichsen and Raney 2006), with a high proportion of polyunsaturated fatty acids (~50% C18:3). Seed yield under European growing conditions rarely exceeds 2.5 t ha<sup>-1</sup> and yield stability is in need of considerable improvement by breeding. On the other hand, the low demand for linseed leads to limited interest from farmers and a corresponding reluctance of breeders to start and maintain a breeding programme.

The crucifer oilseed plant camelina (false flax, gold of pleasure, *Camelina sativa*; see Vollmann et al. 1996) represents an alternative to linseed with similar applications. Camelina is a self-pollinating spring-sown crop that possesses valuable agronomic attributes that make it attractive as an alternative spring-sown crop for tight crop rotations. Seed yields of current camelina varieties usually reach about 2 t ha<sup>-1</sup> (average 1,000-seed weight ~1.5 g) and the oil content of 44–46% (Vollmann et al. 2007) exceeds that of linseed. The oil of camelina is particularly rich

**Table 1** Typical fatty acid compositions of the three major European oilseed crops: the values presented are examples and may vary among varieties or due to genotype-environment interaction

Oil crop species	Variant or type	Origin or source	Fatty acid composition									
			Lauric (12:0)	Myristic (14:0)	Palmitic (16:0)	Stearic (18:0)	Oleic (18:1)	Linoleic (18:2)	Linolenic (18:3)	Eicosenic (20:1)	Erucic (22:1)	Rest
Oilseed rape	High-erucic 00/canola	Wild type	–	–	3	1	11	12	9	8	52	4
		Natural mutation	–	–	4	2	60	21	10	1	1	1
	Low linolenic Lauric	Induced mutant	–	–	4	2	61	28	3	1	–	1
		Genetic engineering	37	4	3	1	33	12	7	–	–	3
Sunflower	High myristic HOLL/HOLLi	Genetic engineering	–	18	23	2	34	15	4	–	–	4
		Induced mutant	–	–	4	1	84	5	3	1	–	2
	Conventional	Wild type	–	–	7	5	19	68	–	–	–	1
	High oleic	Induced mutant	–	–	3	2	92	2	–	–	–	1
Linseed	Conventional	Wild type	–	–	6	4	18	14	58	–	–	–
	Low linolenic	Induced mutant	–	–	6	3	15	73	3	–	–	–

in polyunsaturated C18 fatty acids (30–35% C18:3), making it valuable as a renewable feedstock for the oleochemical industry. Due to its high oil content and relatively stable yield potential, even under conditions of abiotic stress or reduced agronomical and chemical input, interest in camelina is growing in areas where spring canola yields are threatened by water or nutrient stress. In a recent study, a genetic map for *C. sativa* was used to localise quantitative trait loci (QTL) for yield traits and oil content under low-input nitrogen fertilisation, and genome regions were identified that are potentially involved in yield-relevant nutrient efficiency (Gehringer et al. 2006). This study is considered as a starting point for future marker-assisted breeding in order to achieve general improvements in camelina as an alternative spring-annual oilseed crop.

### Oilseed rape production in Europe

No oilseed crop achieves such high and stable seed and oil yields in central Europe than winter oilseed rape, therefore this is without question the most important oilseed species in this region. In Germany, average farm yields currently lie at around  $3.5 \text{ t ha}^{-1}$ , with a peak of  $4 \text{ t ha}^{-1}$  being achieved in 2004 (Statistisches Bundesamt, [www.destatis.de](http://www.destatis.de)). A total of 88 oilseed rape cultivars are currently registered in Germany, 76 of which are winter types (Beschreibende Sortenliste, [www.bundessortenamt.de/](http://www.bundessortenamt.de/)). Since the introduction of the first restored winter oilseed rape hybrid variety in 1995 (Paulmann and Frauen 1997) the proportion of hybrids has grown steadily, with 21 current hybrids comprising almost a third of the 76 registered winter oilseed rape varieties in Germany (Bundessortenamt 2008, [www.bundessortenamt.de](http://www.bundessortenamt.de)). In terms of cultivation, hybrids already represent more than 50% of the German oilseed rape growing area—a trend that is reflected in all of the major growing areas for canola and oilseed rape worldwide. The newest generation of winter oilseed rape hybrids display improved yield performance and stability, and also achieve high and stable oil contents.

Almost all of the oilseed rape production in Europe is from zero erucic acid, low seed glucosinolate types (so-called 00-quality or canola-quality seed). A small amount of high erucic acid rapeseed (HEAR, also called “traditional rapeseed”) is still

grown in Europe for industrial end-uses, however, erucic acid-free oilseed rape/canola oils are ideal for both human nutrition and for use as a biofuel, the two dominant markets for vegetable oils. The seed oil of 00-quality oilseed rape/canola is widely used both as a high-quality edible oil and also as an important renewable resource for non-food purposes. The production of rapeseed has increased rapidly over the past decade due to a massively growing demand for renewable fuels such as biodiesel (rapeseed methylester, RME).

### Oilseed rape seed quality

The most successful oilseed crops complement high seed oil content and quality with a high-value protein or meal product after oil extraction. Mature seeds of oilseed rape are rich in oil (45–50% v/v). The oil from 00-quality oilseed rape contains high amounts of C18 fatty acids, including monounsaturated oleic acid (C18:1, 60% v/v), along with moderate amounts of the polyunsaturates linoleic acid (C18:2, ~30% v/v) and linolenic acid (C18:3, ~10% v/v). Besides the high-quality oil, the meal from oilseed rape after oil extraction also provides a protein-rich animal feed. On the other hand, oilseed rape seed meals have a number of antinutritive components besides glucosinolates—such as sinapate esters, phytate, tannins and crude fibre—that reduce the value of the overall seed quality compared to soybean. Hence, breeding efforts towards increased overall seed quality must focus not only on improvement of oil content and quality, but also on a reduction of antinutritive factors. A key to success is the availability or development of high-throughput screening and selection techniques for accurate phenotyping of all relevant seed oil and meal characters.

### Seed oil composition and content

Vegetable seed oils represent an assembly of triacylglycerols, specified by their fatty acid composition, which are stored in oil bodies (oleosomes) of the cotyledons. Traditional rapeseed oil accumulates high amounts of erucic acid (C22:1) comprising 45–50% of the total fatty acids. HEAR varieties are not used for the production of edible oil in Europe because of

potential deleterious effects of erucic acid, such as abnormal fat accumulation in animal and human tissue and the induction of myocardial lesions (Hung et al. 1977). Two additive gene loci determine the erucic acid content of rapeseed, explaining roughly 90% of the phenotypic variation. These two loci correspond to A and C genome copies of the gene *Fatty Acid Elongase* (*BnFAE1* and *BnFAE2*, respectively). Recently, Wu et al. (2008) identified a four base-pair deletion in the coding sequence responsible for the low erucic acid trait. Because *BnFAE1* and *BnFAE2* are responsible for the elongation of oleic (C18:1) to erucic acid (C22:1) in *B. napus*, oil from low erucic-acid oilseed rape has a desirable fatty acid composition with oleic acid replacing erucic acid as the main component. With a maximum of 5% saturated, 60% monounsaturated and 35% polyunsaturated fatty acids, it fits perfectly to dietary recommendations for a 2:1 ratio of monounsaturates to polyunsaturates. For high-temperature frying oils, on the other hand, further reductions in polyunsaturated fatty acids, particularly linolenic acid, are desirable. Hence, the development of cultivars combining high oleic acid and low linolenic acid is a major current breeding aim for quality improvement of oilseed rape. This so-called HOLLI (or HOLL) trait, which provides a higher oxidative stability at high cooking temperatures, is related to mutations in the *Fatty Acid Desaturase* genes *FAD2* and *FAD3*, which control the enzymes involved in desaturation of oleic (C18:1) to linoleic acid (C18:2) and linoleic to linolenic acid (C18:3), respectively. Hu et al. (2006) demonstrated that mutations at one to two *FAD2* loci and two to three *FAD3* loci control C18:2 and C18:3 contents, respectively. Identification of the responsible mutations as single nucleotide polymorphisms (SNP) in the *FAD2* and *FAD3* sequences allowed the development of molecular markers for the direct selection of alleles for breeding of HOLLI genotypes. Orthologs of the same genes are also promising candidates for modification of fatty acid composition in related *Brassica* oilseeds like mustards or camelina. Other relevant modifications comprise the contents of saturated fatty acids such as stearic (C18:0). For example, down-regulation of the endogenous stearoyl-ACP desaturase (SAD), catalysing the reaction from stearic to oleic acid, using an antisense approach has led to low- and high-erucic rapeseed prototypes with increased amounts of stearic acid in the seed oil (Zarhloul et al. 2006).

In addition to fatty acids, lipid soluble secondary compounds are other determinants of oil quality. For example, tocochromanols (e.g. tocopherols) determine oxidative stability of the oil but are also industrially interesting compounds because of their essential function in nutrition (vitamin E). To increase the tocochromanol content in rapeseed oil, transgenic approaches were undertaken: For example, co-expression of a hydroxyphenylpyruvate dioxygenase gene together with both a homogentisate phytyltransferase gene and a tocopherol cyclase gene lead to maximum increases of up to two fold tocochromanol content in individual plants, and this phenotype was found to be stably inherited in transgenic *B. napus* lines. The results have shown that the three enzymes are critical in determining the total tocochromanol content and composition in rapeseed oil (Raclaru et al. 2006).

Besides the improvement of the fatty acid composition, an increase in the oil content and seed oil yield of oilseed rape cultivars is a major ongoing aim of modern breeding programmes. Unfortunately, the complex genetic background and determinism of seed oil content in the complex polyploid *B. napus* is only poorly understood. Interactions among a large number of gene loci (QTL) are involved in determining seed oil content, and a strong environmental modification of seed oil content has been observed (e.g. Nesi et al. 2008). Further investigations are essential to achieve a deeper knowledge of this trait in order to further improve oil content in high-yielding cultivars. In this context, the identification and utilisation of genes contributing to oil content via comparative QTL mapping in different genetic backgrounds could help to identify gene loci with a key influence on this complex trait in oilseed rape. In a first such comparative study, Delourme et al. (2006) identified homologous genomic regions involved in oil content in different genetic backgrounds and identified novel alleles in individual lines. Such work lays a foundation for marker-assisted combination of favourable alleles at different QTL (so-called pyramiding) to increase seed oil content in modern oilseed rape genotypes.

### Oilseed rape protein content and composition

Rapeseed extraction meal (REM) after oil extraction represents a valuable feedstuff for animal nutrition and a potential protein source for human nutrition. The meal



possesses about 40% protein (dry weight after oil extraction) with a favorable composition of amino acids, including comparatively high contents of the essential sulphuric amino acids methionine and cysteine (Downey and Bell 1990). In addition, the meal is rich in minerals (particularly Ca, Mg and P) and contains vitamins B4 and E (Thies 1994). The major seed storage protein fractions in oilseed rape are the cruciferins (12S globulins) and the napins (2S albumins). The cruciferin/napin ratio has a broad range from 0.7 to 2, whereby the napin fraction contains higher levels of essential sulphuric and aromatic amino acids. Therefore, napin is of higher value and interest for the improvement of REM quality for human and animal nutrition. Meals derived from 00-quality (canola) seeds show a higher cruciferin/napin ratio than meals from traditional rapeseed, presumably due to an altered amino acid composition caused by a reduced quantity of aliphatic amino acid-derived glucosinolates (Malabat et al. 2003). A similar relationship between glucosinolate metabolism and amino acid biosynthesis is known from *Arabidopsis* (Field et al. 2004). Glucosinolates are secondary plant metabolites derived from different amino acids, such as methionine, phenylalanine and tryptophane, and they also contain sulphate and thioglucose moieties (Halkier and Du 1997). Glucosinolates and their degradation products play an important role in pest and disease defense reactions. On the other hand, high amounts of glucosinolates in the seed meal lead to a bitter taste and astringency that limits the acceptance of REM feeds by animals such as pigs. Moreover, an excessive uptake of glucosinolates can result in goitrogenic hypertrophy.

The low glucosinolate trait was first identified in the Polish spring rape variety 'Bronowski', which was then used for breeding of 00-quality canola and oilseed rape cultivars. In comparison to older rapeseed varieties with contents of 60–100  $\mu\text{mol}$  glucosinolates  $\text{g}^{-1}$  seed, modern 00-quality oilseed rape/canola varieties show a remarkably low glucosinolate contents of 8–15  $\mu\text{mol}$   $\text{g}^{-1}$  seed. Nevertheless, further reductions in glucosinolate content are desirable to enable a universal use of REM for feeding of both ruminant and monogastric livestock. Breeding efforts towards very low glucosinolate content are difficult due to the complex and interrelated biosynthesis of different glucosinolate compounds, however, some spring canola breeding lines have been achieved with almost no aliphatic glucosinolates (Rakow, AAFC, Saskatoon, Canada,

personal communication). In this respect it is interesting that an association of genes involved in glucosinolate metabolism with QTL for seed glucosinolate content has been found by association studies with diverse oilseed rape germplasm (Hasan et al. 2008). This finding suggests the possibility of seed specific reduction of seed glucosinolate content by transgressive segregation in genetically diverse gene pools. If seed-specific genes are targeted then a seed-specific reduction could be achieved without changing contents in other plant tissues and organs, which may be beneficial regarding vigour and stress resistance.

Another major group of antinutritive components reducing the overall value of REM are sinapine and related phenolic acids. Although sinapate esters are important metabolites involved in UV protection, their bitter taste diminishes the value of animal feeds and in particular cases (poultry feeds) even low levels of sinapine are generally undesirable. Since very little natural variation for seed sinapine content is available in *B. napus*, efforts to reduce sinapine biosynthesis in oilseed rapeseeds have focussed on gene downregulation via transgenic approaches. For example, Milkowski et al. (2000, 2004) identified the key sinapine biosynthesis enzymes *UDP-glucose:sinapate glucosyl-transferase* (*SGT*) and *1-O- $\beta$ -sinapoyl-glucose:cholin-sinapoyl-transferase* (*SCT*) that catalyse the formation of 1-O- $\beta$ -sinapoyl and sinapoylcholine, respectively. Subsequently, Hüsken et al. (2005) suppressed *SGT* gene expression in transgenic *B. napus* plants via double-stranded RNA interference (RNAi), achieving reductions in seed sinapine content of up to 70% compared to conventional oilseed rape cultivars. Similarly, Bhinu et al. (2009) achieved reductions of up to 90% in seed sinapine content by using combined antisense downregulation of *ferulic acid 5-hydroxylase* (*FAH*) and *SCT*. These results are very promising with regard to a broad improvement of rapeseed quality. Genes identified by this approach are also interesting candidates for identification of new allelic variants using mutagenesis techniques like TILLING (targeting induced local lesions in genomes; Colbert et al. 2001).

### Improvement of seed quality: seed coat thickness and the yellow-seed trait

In contrast to soybean, the seed coat in small-seeded oilseed species like *B. napus* contributes a significant



proportion of the total seed volume. The dark-coloured seed coat of oilseed rape is therefore the main cause of the high fibre and tannin content of REM. Dehulling experiments with *B. napus* seeds have shown that this achieves reduced tannin and fibre contents in REM from different rapeseed varieties, demonstrating that antinutritive tannins and fibre compounds are mainly localized in the seed coat (Matthäus 1998). Breeding of rapeseed varieties with a thinner testa could therefore result in a reduction of fibre content in the meal and consequently improve the digestibility of REM. Generally, the reduction of seed coat contribution in yellow seeded oilseed rape should result in an increased overall contribution of the embryo to the seed weight, meaning that oil and protein contents are expected to both rise proportionally (Slominski et al. 1994, 1999; Marles and Gruber 2004). In contrast to this generally held view, however, we have found that the reduction in seed coat in yellow-seeded lines is often accompanied by an increase in protein content with no significant effect on oil content (e.g. Table 2). This observation might be explained biochemically by an increased availability of amino acid precursors, due to reduced production of fibre and other phenolic compounds in lines with a thinner seed coat. This would lead to an increased potential for seed storage protein biosynthesis and a corresponding increase in total protein content. Provided the oil content is not negatively affected, the nutritional value of the seed meal and thus the overall seed value will therefore be raised in yellow-seeded oilseed rape not only by a reduction in antinutritive fibre and tannins but also by a potential increase in napin seed storage proteins and their essential amino acids.

Since seed colour is very sensitive to environmental conditions, however, its use as a morphological selection marker for reduced antinutritive fibre is difficult and it may be hard to develop pure-breeding varieties. An alternative option is the development and application of high-throughput screening techniques

for seed coat fibre components, independently of the seed colour. Currently, chemical detergent methods are generally used to determine the seed fibre content based on components extracted as neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL). However, these methods are time-consuming and costly, and require destruction of seed samples, therefore they cannot be applied in a practical breeding programme. Hence the development of low cost, non-destructive, high throughput screening and selection techniques to measure seed fibre compounds would greatly increase breeding efficiency. Font et al. (2005) reported on the possibility to estimate acid detergent fibre in oilseed rape via near infrared reflectance spectroscopy (NIRS), and Badani et al. (2006) showed a common genetic control of ADF content and seed colour. Today NIRS is widely used in oilseed rape breeding as a non-destructive and high-throughput method for screening and selection of numerous traits in large breeding populations; hence new NIRS calibrations for major seed fibre fractions could be readily implemented into breeding programs.

Using a broad range of materials including yellow, brown and black-seeded genotypes of genetically diverse backgrounds, we have developed new NIRS calibration equations for NDF, ADF and ADL content in oilseed rape seed samples (unpublished data). Particularly good correlation statistics were obtained with the new calibrations for ADL content, with a high coefficient of determination for the cross validation ( $R^2_{cv} = 0.836$  and  $0.895$  for macrocuvette and microcuvette calibrations, respectively). Since ADL, the predominant antinutritive fraction in *B. napus* seeds, is one of the key antinutritive fraction that is strongly reduced in yellow seeds, NIRS-assisted selection for ADL content is therefore a promising method for rapid selection of breeding lines with greatly improved nutritional value.

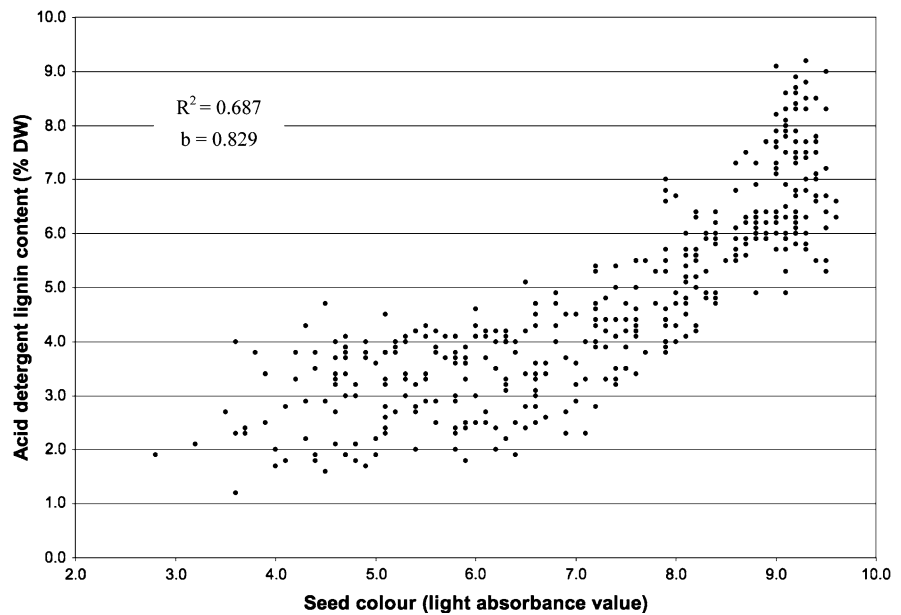
As expected, ADL content was found to have a significant correlation ( $R^2 = 0.687$ ) to seed colour in the large set of genotypes we used to develop the

**Table 2** Seed contents of the detergent fibre compounds neutral detergent fibre (NDF), acid detergent fibre (ADF) and acid detergent lignin (ADL) compared to oil, protein and total

DH line	Seed colour	NDF (% DW)	ADF (% DW)	ADL (% DW)	Oil (% DW)	Protein (% DW)	GSL ( $\mu\text{mol/g}$ )
YE2-DH162	Yellow	14.47	9.63	3.24	44.63	25.34	14.45
YE2-DH897	Black	17.97	12.71	5.91	44.45	22.45	14.98

seed glucosinolate (GSL) contents in two closely related winter oilseed rape DH lines with yellow and black seed colour, respectively

**Fig. 1** Scatter plot showing the correlation between acid detergent lignin (ADL, % dry weight) content and seed colour (light absorbance value) in a set of 393 yellow, brown and black-seeded rapeseed lines of genetically diverse origin. Both traits and seed colour were analysed using NIRSystems 6500 calibrations. Seeds with yellow to brown colour (seed colour value 2–7) always have a low ADL content (maximum of 5.5% DW), while black-seeded lines (seed colour value 8–10) show a broad variation in ADL from <4% to >9% DW



**Table 3** Pearson correlation coefficients ( $r$ ) among seed quality traits in a set of 54 dark-seeded winter oilseed rape varieties

Pearson's Correlation	Oil	Protein	GSL	NDF	ADF	ADL	PA
Colour	0.421**	−0.519**	−0.128	0.313*	0.414**	0.591**	0.259
Oil	–	−0.425**	−0.113	−0.505**	0.242	0.275	0.059
Protein		–	0.447**	−0.128	−0.594**	−0.219	0.001
GSL			–	0.245	−0.258	0.306*	0.639**
NDF				–	0.503**	0.554**	0.358*
ADF					–	0.619**	0.028
ADL						–	0.514**

The correlations are based on mean trait values (NIRS estimates) for each genotype from three independent environments, corrected for moisture content

GSL total glucosinolate content; NDF neutral detergent fibre; ADF acid detergent fibre; ADL acid detergent lignin; PA total phenolic acids

\*, \*\* Significant at the 0.05 and 0.01 levels, respectively

NIRS calibration (Fig. 1). However, although the different light-seeded genotypes we tested always had low ADL content, despite their different genetic background, an unexpected level of variation was found for ADL content among dark-seeded oilseed rape. Detailed analysis of a set of genetically diverse, black-seeded winter oilseed rape varieties for seed fibre and other relevant seed compounds showed that much potential for improvement of meal quality is already present in dark-seeded materials (Table 3). Thus, selection via NIRS could enhance protein content and meal quality in conventional dark-seeded varieties, independently of the seed colour. This is

presumably the result of genes influencing the seed coat thickness without compensating the pigment production. Of particular interest was the observation that black-seeded winter oilseed rape with reduced ADL content tend to have an improved protein content, whereas the reduction in ADL appears to be associated with a negative influence on the oil content (Table 3). This increased protein content in low-ADL lines, and the lack of a clear association with increased oil content, corresponds to our findings in some yellow-seeded *B. napus* accessions and appears to contradict the widespread assertion that reduced seed coat thickness is associated per se with an

increase in both oil and protein content. Although the effect on meal quality should be viewed positively, the oil is still the seed component with the highest commercial value and must therefore not be diminished at the expense of protein. Selection for reduced seed ADL content must therefore be combined with selection for high-oil types to avoid an overall oil yield penalty.

Since ADL in *B. napus* seeds is mainly derived from phenolic S-monolignol precursors, reduction of ADL due to a thinner seed coat might be expected to simultaneously reduce the total quantity of antinutritive seed phenolic acids, such as sinapine. This may explain the significant correlation we observed between ADL content and total phenolic acid content in black-seeded varieties (Table 3). Interestingly, the phenolic acid content of the black-seeded varieties also showed a significant positive correlation to the seed glucosinolate content. This suggests that mutations in genes responsible for biosynthesis of common precursors for S-monolignols, phenolic acids and glucosinolates, as described by Hemm et al. (2003), for example, could be responsible for the variation in ADL content. By high-throughput selection of low-sinapine breeding lines it may therefore be simultaneously possible to indirectly select for new allelic variation for the low-glucosinolate trait. Reliable NIRS calibrations for sinapine (Zum Felde et al. 2007) would thus also represent a useful addition to current selection tools. New oilseed rape varieties with reduced ADL, lowered sinapine and other major phenolic acids, further reduced glucosinolate content and a consequentially increased proportion of napin seed storage proteins could result in a considerably increased overall value of REM for animal and potentially also for human nutrition.

**Acknowledgments** Part of this work was funded by the German Federal Ministry for Education and Research BMBF within the project GABI-YellLowSin (Grant No. 0313703A). We thank Abbas Rezaidad and Susmiha Katha for as-yet unpublished data on phenolic acids in black-seeded oilseed rape varieties.

## References

- Badani AG, Snowdon RJ, Baetzel R, Lipsa FD, Wittkop B, Horn R, De Haro A, Font R, Lühs W, Friedt W (2006) A model for the inheritance of seed colour in oilseed rape (*Brassica napus* L.) based on analyses of segregation data, QTL and associated quality traits in two genetically distinct crosses. *Genome* 49:1499–1509. doi:10.1139/G06-091
- Bhinu VS, Schäfer U, Li R, Huang J, Hannoufa A (2009) Targeted modulation of sinapine biosynthesis pathway for seed quality improvement in *Brassica napus*. *Transgenic Res* 18:31–44. doi:10.1007/s11248-008-9194-3
- Colbert T, Till BJ, Tompa R, Reynolds S, Steine MN, Yeung AT, McCallum CM, Comai L, Henikoff S (2001) High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol* 126:480–484. doi:10.1104/pp.126.2.480
- Delourme R, Falentin C, Huteau V, Clouet V, Horvais R, Gandon B, Specel S, Hanneton L, Dheu JE, Deschamps M, Margale E, Vincourt P, Renard M (2006) Genetic control of oil content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 113:1331–1345. doi:10.1007/s00122-006-0386-z
- Diederichsen A, Raney JP (2006) Seed colour, seed weight and seed oil content in *Linum usitatissimum* accessions held by Plant Gene Resources of Canada. *Plant Breed* 125:372–377. doi:10.1111/j.1439-0523.2006.01231.x
- Downey RK, Bell JM (1990) New developments in canola research. In: Shahidi F (ed) *Canola and rapeseed—production, chemistry, nutrition and processing technology*. Van Nostrand Reinhold, New York, pp 37–46
- Field B, Cardon G, Traka M, Bottermann J, Vancanneyt G, Mithen R (2004) Glucosinolate and amino acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 135:828–839. doi:10.1104/pp.104.039347
- Font R, Wittkop B, Badani AG, Del Rio-Celestino M, Friedt W, Lühs W, De Haro-Baillon A (2005) The measurements of acid detergent fibre in rapeseed by visible and near-infrared spectroscopy. *Plant Breed* 124:410–412. doi:10.1111/j.1439-0523.2005.01138.x
- Gehring A, Friedt W, Lühs W, Snowdon RJ (2006) Genetic mapping of agronomic traits in false flax (*Camelina sativa* subsp. *sativa*). *Genome* 49:1555–1563. doi:10.1139/G06-117
- Halkier BA, Du L (1997) The biosynthesis of glucosinolates. *Trends Plant Sci* 11:425–431. doi:10.1016/S1360-1385(97)90026-1
- Hasan M, Friedt W, Freitag NM, Link K, Pons-Kühnemann J, Snowdon RJ (2008) Association of gene-linked SSR markers to seed glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*). *Theor Appl Genet* 116:1035–1049. doi:10.1007/s00122-008-0733-3
- Hemm MR, Ruegger MO, Chapple C (2003) The arabidopsis *ref2* mutant is defective in the gene encoding CYP83A1 and shows both phenylpropanoid and glucosinolate phenotypes. *Plant Cell* 15:179–194. doi:10.1105/tpc.006544
- Hu X, Sullivan-Gilbert M, Gupta M, Thompson SA (2006) Mapping of the loci controlling oleic and linolenic acid contents and development of *fad2* and *fad3* allele-specific markers in canola (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet* 113:497–507. doi:10.1007/s00122-006-0315-1
- Hung S, Umemura T, Yamashiro S, Slinger SJ, Holub BJ (1977) The effects of original and randomised rapeseed oils containing high or very low levels of erucic acid on cardiac lipids and myocardial lesions in rats. *Lipids* 12:215–221. doi:10.1007/BF02533297
- Hüsken A, Baumert A, Strack D, Becker HC, Möllers C, Milkowski C (2005) Reduction of sinapate ester content in

- transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) by dsRNAi-based suppression of *BnSGT1* gene expression. *Mol Breed* 16:127–138. doi:[10.1007/s11032-005-6825-8](https://doi.org/10.1007/s11032-005-6825-8)
- Malabat C, Atterby H, Chaudhry Q, Renard M, Guéguen J (2003) Genetic variability of rapeseed protein composition. In: Sorensen H, Sorensen JC, Sorensen S, Bellostas Muguerza N, Bjergegaard C (eds) 11th International Rapeseed Congress—Enhanced value of cruciferous oilseed crops by optimal production and use of the high quality seed components. Copenhagen, pp 205–208
- Marles S, Gruber MY (2004) Histochemical characterisation of unextractable seed coat pigments and quantification of extractable lignin in the *Brassicaceae*. *J Sci Food Agric* 84:251–262. doi:[10.1002/jsfa.1621](https://doi.org/10.1002/jsfa.1621)
- Matthäus B (1998) Effect of dehulling on the composition of antinutritive compounds in various cultivars of rapeseed. *Fett/Lipid* 100:295–301
- Milkowski C, Baumert A, Strack D (2000) Cloning and heterologous expression of a rape cDNA encoding UDP-glucose:sinapate glucosyltransferase. *Planta* 211:883–886. doi:[10.1007/s004250000411](https://doi.org/10.1007/s004250000411)
- Milkowski C, Baumert A, Schmidt D, Nehlin L, Strack D (2004) Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *Plant J* 38:80–92. doi:[10.1111/j.1365-3113X.2004.02036.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2004.02036.x)
- Nesi N, Delourme R, Bregeon M, Falentin C, Renard M (2008) Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of *Brassica napus* L. seed. *C R Biol* 331:763–771. doi:[10.1016/j.crv.2008.07.018](https://doi.org/10.1016/j.crv.2008.07.018)
- Paulmann W, Frauen M (1997) The firstly restored F1-hybrids of winter oilseed rape. *GCIRC Bull* 13:24–25
- Raclaru M, Gruber J, Kumar R, Sadre R, Lühs W, Zarhloul KM, Friedt W, Frentzen M, Weier D (2006) Increase of the tocochromanol content in transgenic *Brassica napus* seeds by overexpression of key enzymes involved in prenylquinone biosynthesis. *Mol Breed* 18:93–107. doi:[10.1007/s11032-006-9014-5](https://doi.org/10.1007/s11032-006-9014-5)
- Slominski BA, Campbell LD, Guenter W (1994) Carbohydrates and dietary fibre components of yellow and brown-seeded canola. *J Agric Food Chem* 42:704–707. doi:[10.1021/jf00039a020](https://doi.org/10.1021/jf00039a020)
- Slominski BA, Simbaya J, Campbell LD, Rakow G, Guenter W (1999) Nutritive value for broilers of meals derived from newly developed varieties of yellow-seeded canola. *Anim Feed Sci Technol* 78:249–262. doi:[10.1016/S0377-8401\(99\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00003-6)
- Thies W (1994) Die wertbestimmenden Komponenten des Rapsschrotes. *Vortr Pflanzenzüchtg* 30:89–97
- Vollmann J, Damboeck A, Eckl A, Schrems H, Ruckebauer P (1996) Improvement of *Camelina sativa*, an underexploited oilseed. In: Janick J (ed) *Progress in new crops*. ASHS Press, Alexandria, pp 357–362
- Vollmann J, Moritz T, Kargl C, Baumgartner S, Wagentristsl H (2007) Agronomic evaluation of camelina genotypes selected for seed quality characteristics. *Ind Crops Prod* 26:270–277. doi:[10.1016/j.indcrop.2007.03.017](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2007.03.017)
- Wu G, Wu Y, Xiao L, Li X, Lu C (2008) Zero erucic trait of rapeseed (*Brassica napus* L.) results from a deletion of four base pairs in the *fatty acid elongase 1* gene. *Theor Appl Genet* 116:491–499. doi:[10.1007/s00122-007-0685-z](https://doi.org/10.1007/s00122-007-0685-z)
- Zarhloul MK, Stoll C, Lühs W, Friedt W (2006) Breeding high-stearic oilseed rape (*Brassica napus*) with high- and low-erucic background using optimised promoter-gene constructs. *Mol Breed* 18:241–251. doi:[10.1007/s11032-006-9032-3](https://doi.org/10.1007/s11032-006-9032-3)
- Zum Felde T, Baumert A, Strack D, Becker HC, Möllers C (2007) Genetic variation for sinapate ester content in winter rapeseed (*Brassica napus* L.) and development of NIRS calibration equations. *Plant Breed* 126:291–296. doi:[10.1111/j.1439-0523.2007.01342.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01342.x)

---

### **3.2 Regional association analysis delineates a sequenced chromosome region influencing antinutritive seed meal compounds in oilseed rape**

Rod J. Snowdon, B. Wittkop, A. Rezaidad, M. Hasan, F. Lipsa, A. Stein, and W. Friedt

*Genome* **2010**, 53, 917-928.

# Regional association analysis delineates a sequenced chromosome region influencing antinutritive seed meal compounds in oilseed rape<sup>1</sup>

R.J. Snowdon, B. Wittkop, A. Rezaidad, M. Hasan, F. Lipsa, A. Stein, and W. Friedt

**Abstract:** This study describes the use of regional association analyses to delineate a sequenced region of a *Brassica napus* chromosome with a significant effect on antinutritive seed meal compounds in oilseed rape. A major quantitative trait locus (QTL) influencing seed colour, fibre content, and phenolic compounds was mapped to the same position on *B. napus* chromosome A9 in biparental mapping populations from two different yellow-seeded × black-seeded *B. napus* crosses. Sequences of markers spanning the QTL region identified synteny to a sequence contig from the corresponding chromosome A9 in *Brassica rapa*. Remapping of sequence-derived markers originating from the *B. rapa* sequence contig confirmed their position within the QTL. One of these markers also mapped to a seed colour and fibre QTL on the same chromosome in a black-seeded × black-seeded *B. napus* cross. Consequently, regional association analysis was performed in a genetically diverse panel of dark-seeded, winter-type oilseed rape accessions. For this we used closely spaced simple sequence repeat (SSR) markers spanning the sequence contig covering the QTL region. Correction for population structure was performed using a set of genome-wide SSR markers. The identification of QTL-derived markers with significant associations to seed colour, fibre content, and phenolic compounds in the association panel enabled the identification of positional and functional candidate genes for *B. napus* seed meal quality within a small segment of the *B. rapa* genome sequence.

**Key words:** *Brassica napus*, seed meal quality, association analysis, QTL mapping.

**Résumé :** Cette étude décrit une analyse d'association régionale pour délimiter une région séquencée d'un chromosome du *Brassica napus* qui a un effet significatif sur la teneur en composés antinutritionnels dans le tourteau de colza. Un QTL majeur influençant la couleur des graines, la teneur en fibres et les composés phénoliques a été localisé à une même position sur le chromosome A9 chez le *Brassica napus* au sein de populations biparentales issues de deux croisements entre colzas à graines jaunes et colzas à graines noires. Les séquences des marqueurs distribués au sein de cette région ont permis d'observer de la synténie avec un contig de séquence provenant de la région correspondante du chromosome A9 du *Brassica rapa*. La cartographie de marqueurs provenant du contig de séquences du *B. rapa* a permis de confirmer leur localisation au sein du QTL. Un de ces marqueurs s'est également avéré lié à un QTL déterminant la couleur des graines et la teneur en fibres sur le même chromosome au sein d'un croisement entre un *B. napus* à graines noires et un autre à graines jaunes. En conséquence, une analyse d'association régionale a été réalisée sur un groupe varié d'accessions de colzas oléagineux d'automne à graines noires. Des marqueurs microsatellites (SSR) très proches les uns des autres et couvrant le contig de séquence de la région QTL ont été employés. Une correction pour la structure de la population a été réalisée à l'aide d'un jeu de marqueurs SSR distribués sur l'ensemble du génome. L'identification de marqueurs dérivés du QTL et affichant des associations significatives avec la couleur des graines, la teneur en fibres et en composés phénoliques au sein de ce groupe d'accessions a permis d'identifier des gènes candidats pour la qualité du tourteau chez le *B. napus* sur une base positionnelle et fonctionnelle au sein d'un petit segment du génome du *B. rapa*.

**Mots-clés :** *Brassica napus*, qualité du tourteau, analyse d'association, cartographie QTL.

Received 28 December 2009. Accepted 2 May 2010. Published on the NRC Research Press Web site at genome.nrc.ca on 5 November 2010.

Corresponding Editor: M. Francki.

**R.J. Snowdon,<sup>2</sup> B. Wittkop, A. Rezaidad,<sup>3</sup> M. Hasan,<sup>4</sup> F. Lipsa, A. Stein, and W. Friedt.** Department of Plant Breeding, Justus Liebig University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, Giessen 35392, Germany.

<sup>1</sup>This article is one of a selection of papers from the conference "Exploiting Genome-wide Association in Oilseed Brassicas: a model for genetic improvement of major OECD crops for sustainable farming".

<sup>2</sup>Corresponding author (e-mail: rod.snowdon@agr.uni-giessen.de).

<sup>3</sup>Present address: Department of Agronomy and Plant Breeding, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Tehran, Iran.

<sup>4</sup>Present address: Department of Plant Production and Protection, Faculty of Agricultural Technology, Al-Balqa' Applied University, Al-Salt 19117, Jordan.



## Introduction

Detection of marker–trait associations based on linkage disequilibrium (LD) in genetically diverse materials can identify markers with direct linkage to genes showing significant effects on the trait. Association mapping approaches are based on the LD between linked loci, the degree of which depends on the extent and structure of LD in the population analyzed. Since LD decays as a result of recombination (Flint-Garcia et al. 2003), the extent of LD in a given population is governed by the population history and the mating system of the species under study. In plant breeding populations LD mapping has seldom been used for marker development (Breseghello and Sorrells 2006), although association approaches can be particularly suitable for identification of useful allelic variation in genetically diverse genotype collections (Flint-Garcia et al. 2003). Association studies are generally performed in species for which extensive sequence data or genome-wide single nucleotide polymorphism (SNP) screening technologies are available. There are numerous examples of successful application of association mapping via whole-genome or candidate gene approaches in well-characterized plants such as *Arabidopsis* (e.g., Aranzana et al. 2005; Zhao et al. 2007b), rice (e.g., Garriss et al. 2003), and maize (e.g., Remington et al. 2001; Thornsberry et al. 2001; Wilson et al. 2004). As the *Brassica rapa* genome sequence becomes available and new, genome-wide sequence polymorphism assays are developed, for example using next-generation sequencing data, genome-wide association studies will also become a powerful tool for *Brassica* species.

In the meantime a small number of studies have demonstrated that local association mapping approaches based on candidate gene sequences or gene-linked markers can be successfully used for allele–trait association analysis in *Brassica* crop species. For example, Österberg et al. (2002) and Yuan et al. (2009) identified sequence variants of key flowering time candidate genes that were associated with flowering time in *B. nigra* and *B. rapa*, respectively, while Hasan et al. (2008) utilized *Brassica*–*Arabidopsis* synteny to develop candidate gene-linked simple sequence repeat (SSR) markers with associations to seed glucosinolate content in *B. napus*. On the other hand, Zhao et al. (2007a) used genome-wide markers for association mapping of leaf traits, flowering time, and phytate content in *B. rapa* and found some trait-associated markers that could be confirmed by conventional QTL mapping in biparental crosses.

The development of oilseed rape or canola (*Brassica napus* L.) with reduced levels of antinutritive seed phenolic acid and fibre compounds would considerably improve the value of the seed meal that is used as an animal feed after oil extraction. The thinner seed coat of yellow-seeded *B. napus* lines leads to significant reductions in undigestible fibre and condensed tannins (Wittkop et al. 2009); however, seed colour has low heritability and is thus difficult to use in breeding for improved meal quality. Numerous studies (e.g., Badani et al. 2006; Fu et al. 2007; Xiao et al. 2007) have described a major QTL for seed colour on one of the homoeologous *B. napus* chromosomes N9 (A9) or N18 (C8). We have found that the major QTL for seed colour

and seed fibre content that we identified in two different yellow-seeded sources (Badani et al. 2006) also significantly and consistently influences meal quality, but not seed colour, in crosses between different dark-seeded oilseed rape lines (A. Stein et al., unpublished data). This opens the possibility for discovery and utilization of allelic diversity at this locus to breed for improved meal quality independently of seed colour.

In this study, the genomic sequence of a *B. rapa* bacterial artificial chromosome (BAC) contig spanning the major seed colour and meal quality QTL on *B. napus* chromosome A9 was used to identify densely spaced in silico SSR primers to use for regional association analysis in a panel of genetically diverse, adapted winter oilseed rape genotypes. Detailed phenotyping of seed fibre components and phenolic compounds was performed to aid dissection of the seed colour trait into contributing components. The aim was to identify markers associated with a positive effect on meal quality in dark-seeded oilseed rape and uncover positional and functional candidate genes in the physical proximity of the most promising trait-associated markers.

## Materials and methods

### Plant materials

A panel of 49 genetically diverse, winter-type *B. napus* inbred lines (predominantly adapted European oilseed rape) were used for the allele–trait association studies (see Table S1).<sup>5</sup> All lines were derived from genetically diverse cultivars that were self-pollinated for at least six generations to generate pure inbred seed for the marker analyses and phenotyping. The panel was selected based on pedigree knowledge to broadly cover the genetic and phenotypic variation present in current western European cultivars. More than half of the 49 genotypes were derived from cultivars or breeding lines with low or double-low seed quality. The diversity panel was grown in Einbeck, Germany, in the growing seasons 2002–2003, 2003–2004, and 2005–2006. Plants were self-pollinated by bagging and left in the field until all pods were mature. Seed samples were stored in the dark in a cool, dry storage room until the quality analysis was performed.

### Evaluation of seed colour and fibre compounds via NIRS

Measurements for seed colour and fibre components were obtained by near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) using an NIR System 6500 with WinISI II software (FOSS GmbH, Rellingen, Germany). Phenotype values for seed colour (visual light absorbance), acid detergent lignin content (ADL, % seed dry mass), acid detergent fibre content (ADF, % seed dry mass), and neutral detergent fibre content (NDF, % seed dry mass) were extrapolated from NIRS spectra using NIRS calibrations developed specifically for measurement of these traits in *B. napus* (see Wittkop et al. 2009). NIRS-derived estimates for each trait were taken from one representative self-pollinated plant per accession per year and averaged over two technical repetitions. Mean values of each genotype over all 3 years were used as the basis for the

<sup>5</sup>Supplementary data for this article are available on the journal Web site (<http://genome.nrc.ca>).

subsequent association analysis for seed colour and fibre components.

### Extraction of phenolic acids and proanthocyanidins

Selfed seed samples from Einbeck 2005–2006 were also used for isolation and quantification of different phenolic acid and proanthocyanidin fractions in the seed meal. Phenolic fractions representing phenolic acids, monomeric and oligomeric proanthocyanidins, and polymeric pigment complexes, respectively, were extracted sequentially from defatted meal by solid-phase extraction using methods adapted from Matthäus (1998), Naczek et al. (2000), and Sun et al. (2006). Briefly, the defatted meal samples were dissolved in methanol and centrifuged, and the supernatant was filtered through cellulose acetate filters. The remaining crude rapeseed meal extract was added to activated, preconditioned C18 mini-columns and the phenolic acids were eluted with water. A second elution with ethyl acetate was performed to isolate a mixture of monomer flavonol and oligomer procyanidin fractions (Sun et al. 2006). These two fractions were separated by sequential elution with diethyl ether and methanol on another activated and preconditioned C18 mini-column. Finally, condensed tannin compounds remaining on the mini-column (free anthocyanins, polymeric proanthocyanins, and other pigmented complexes) were eluted with methanol.

### HPLC quantification of phenolic acids and proanthocyanidins

All the fractions collected from the fractionation procedure were subsequently prepared for analysis by high-performance liquid chromatography (HPLC) according to Matthäus (1998). Internal standards were added to each sample for quantification. Procyanidin B2 (Sigma, Germany) was used as the internal standard for the phenolic acid and condensed proanthocyanidin fractions, while epigallocatechin (Extrasynthese, France) was used as the internal standard for the monomeric and oligomeric proanthocyanidins.

Quantification of the phenolic compounds from all 49 accessions in the diversity set was performed on an HPLC instrument from Merck, Germany. All peaks in each fraction were designated according to their retention time, and the area under each detected peak was compared with the area of the internal standard peak for relative quantification of each peak size in each genotype. Each sample was analyzed twice and the mean peak area from the two measurements was used as an estimate of the relative quantity of the respective compound. Owing to the high cost and effort of the column extractions and HPLC analysis, it was not possible to analyze repetitions for each genotype. However, repeated analyses of selected black-seeded and yellow-seeded lines showed a very high consistency of measurement data from different plants of one genotype (data not shown).

### Statistical analysis of trait data

The PROC GLM procedure of the software SAS 8.1 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) was used for statistical analysis of the seed colour and fibre component data, treating years as replicates and accessions as random effects. Since only technical replications of the NIRS analysis were performed rather than measurements from multiple plants per genotype, it was not possible to determine genotype by

environment (year) interactions. Variance components from the PROC GLM output were used to estimate the broad-sense heritabilities ( $H^2$ ) for each trait.

### Molecular marker analysis

Genomic DNA samples were extracted from young leaves of five pooled plants per genotype using a standard CTAB extraction protocol (Doyle and Doyle 1990). For population structure analysis in the 49 winter oilseed rape genotypes, allelic data from a total of 104 SSR primer combinations that amplified 559 genome-wide marker alleles were kindly provided by the breeding companies KWS Saat AG, SW Seed GmbH, and SaatenUnion Biotec GmbH.

In double haploid and  $F_2$  populations from the cross 'Express 617' (black seed)  $\times$  '1012-98' (yellow seed), a major QTL was found that explained around 50% of the phenotypic variation for seed colour and ADF content with LOD values of 12.1 and 8.1, respectively (Badani et al. 2006). This QTL was subsequently confirmed for multiple years and locations in 166 double haploid lines from the same cross (A. Stein et al., unpublished data), and a strong influence on ADL content was also determined, underlining the importance of this major locus for seed meal quality. A sequenced *B. rapa* bacterial artificial chromosome (BAC) contig spanning the major QTL for seed colour and fibre content (Fig. 1) was used as the basis for the regional association analysis. This contig is flanked by the sequences of two markers on either side of the major QTL, namely the SSR marker SSR1\_144 and the EST-derived marker At2g22000-SSR (Fig. 1). A total of 20 in silico SSR primer combinations derived from two overlapping *B. rapa* BACs containing these sequences were identified from the *B. rapa* BAC sequence annotation of the Brassica Genome Gateway (<http://brassica.bbsrc.ac.uk/>) and tested for amplification in *B. napus*. Ten in silico SSR primer combinations that gave clear, polymorphic amplification products in the *B. napus* diversity panel (Table 1) were screened in the 49 lines to score allelic diversity. Seven of these markers could also be remapped to the major seed colour QTL on *B. napus* chromosome A9, confirming their linkage to the QTL (A. Stein et al., unpublished data).

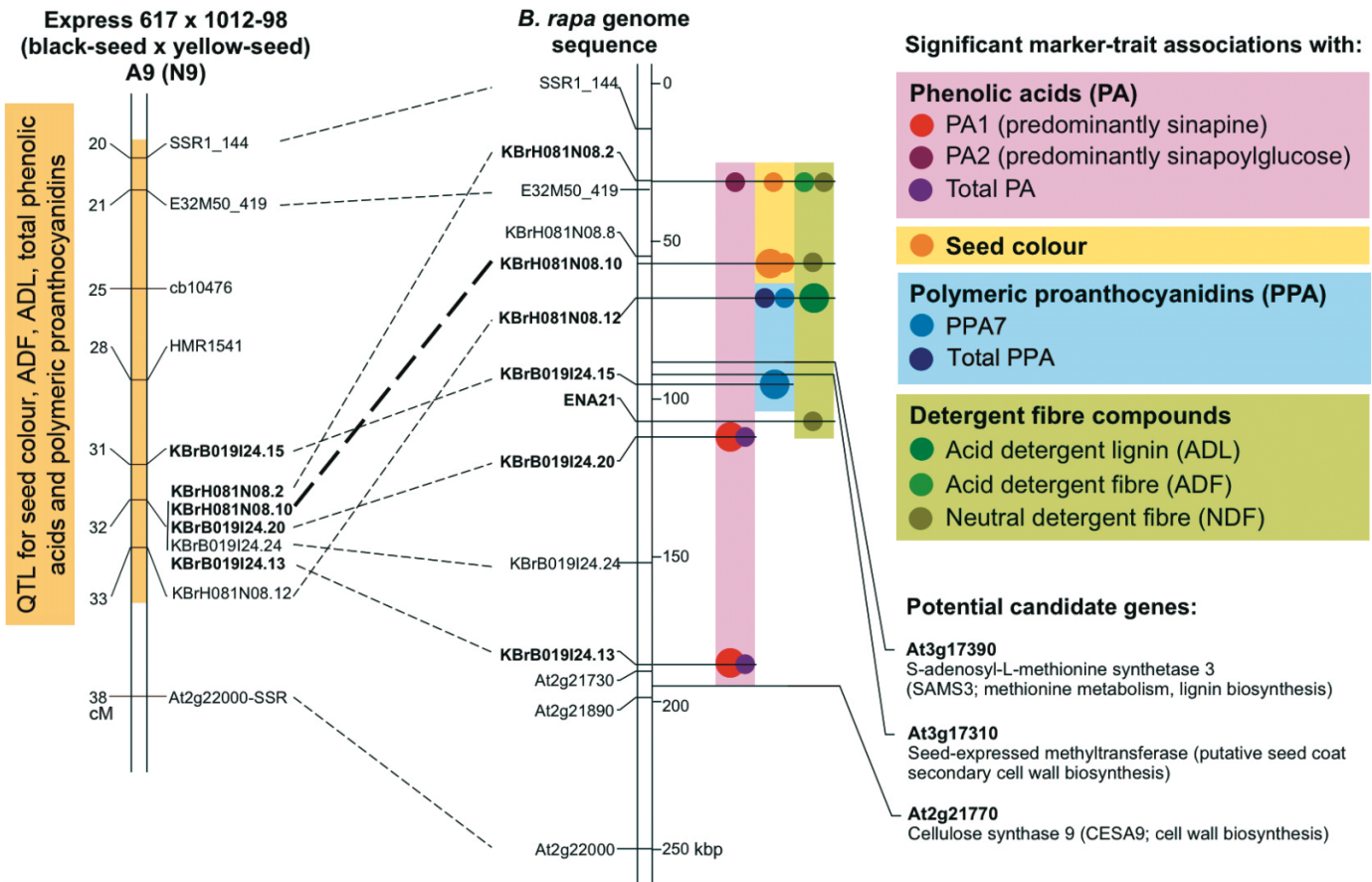
Touchdown PCR was performed as described by Hasan et al. (2008). To reduce primer-labelling costs, PCR products were labelled with the M13-tailing technique described by Berg and Olaisen (1994). The PCR products were separated and visualized using a LI-COR Gene ReadIR 4200 (MWG Biotech, Ebersberg, Germany). Allele sizes including the 23 bp labelled M13 tail sequence were scored with the software RFLP-SCAN (version 2.01, Scanalytics Inc., Fairfax, Virginia, USA) based on a labelled length standard.

### Analysis of population structure

Population structure was assessed with the model-based Bayesian clustering approach of the software STRUCTURE 2.1 (Pritchard et al. 2000) using allelic data from the genome-wide SSR markers. Since SSR primer combinations can amplify multiple homoeologous loci in *B. napus*, and homoplasious alleles may be amplified at different loci, it can be difficult or impossible to assign the different marker alleles to individual loci in genotypes with high allelic diversity. Hence all SSR alleles were scored dominantly as



**Fig. 1.** Comparison of a partial genetic map of *B. napus* chromosome A9 in the cross ‘Express 617’ (black seed) × ‘1012-98’ (yellow seed), containing a major QTL for seed colour, fibre components, phenolic acids, and pigment compounds, with a *B. rapa* genome sequence contig spanning the QTL. The QTL confidence interval is shown by the coloured shading on the genetic map. SSR markers shown in bold on the physical map showed significant ( $P < 0.05$ ) associations with relevant traits (indicated by coloured circles; see colour key) in a diversity panel of dark-seeded *B. napus* genotypes. The larger coloured circles denote marker–trait associations that were also significant with permuted  $P$  values, reducing the likelihood of type I errors. Potential positional and functional candidate genes for seed colour and fibre traits, based on synteny to corresponding sequences from *B. rapa* and *Arabidopsis*, are shown on the right.



**Table 1.** Left and right primer sequences of 10 simple sequence repeat (SSR) markers used for regional association analysis of a major QTL for seed colour, fibre components, and phenolic compounds in *Brassica napus*.

SSR marker	Left primer	Right primer
KBrH081N08-2	AGCTAAGGGTCCGGCTAA	CGGCTCATACGAAAGAGGTC
KBrH081N08-8	GGGCAGCTCTGGTTGTAG	TCTTCCATTTCCTTGATGG
KBrH081N08-10	CTGGTCTTTGAGCGATAG	TCCATTGTTGAGCTATGTGATTG
KBrH081N08-12	TGGTGGTCACATTTAATG	TGGTCTCGAACTTGGTCAGC
KBrB019I24-13	AGAGAGCCAGAGCAAAAAGC	AGCTGCGAATGAACGGTAAG
KBrB019I24-15	CGCACCTGTAGTGCTGAAAC	CCCCGATTCTCGATACAAAG
ENA21	GAGTGTTTGGAGCAGATGA	GGAGACTTTGCCTTTGTGT
KBrB019I24-19	CGGAACTTGGAAACGAAGAC	GCGTTGAGTAAACCGTCAG
KBrB019I24-20	ATGTAAATTTGTTTCATCAATGG	GTCTTCGTAGGACGGCTCAG
KBrB019I24-24	TTGAAGTCATTGTTTCAGAAATGTG	ATCGCTGGCAGAGAGAGAAG

**Note:** All markers were derived from BAC clones from the *B. rapa* genome sequencing project using the Brassica Genome Gateway resource at <http://brassica.bbsrc.ac.uk/>. The names of markers with the prefix “KBr” are adopted from the Brassica Genome Gateway, whereby the first 10 characters represent the BAC clone from which the in silico SSRs were derived. Markers with significant associations to relevant seed traits in a panel of black-seeded winter oilseed rape accessions are shown in Table 3.

present or absent in each genotype. For the same reason no information on marker linkage could be included in the population structure model, so a linkage model could not be applied. Based on prior knowledge of the plant material, we expected little to no admixture between the observed groups, since these were derived from divergent *B. napus* gene pools (Seyis et al. 2003; Hasan et al. 2008). Therefore we applied the model of no admixture. With Bayesian clustering individual genotypes are allocated to groups so that Hardy–Weinberg equilibrium and linkage equilibrium are valid within clusters but absent between clusters. The optimum number of clusters ( $K$ ) was selected after 10 independent runs of a burn-in of 100 000 iterations, followed by 100 000 iterations using a model allowing for no admixture and correlated allele frequencies. As described by Hasan et al. (2008), the highest average likelihoods for the population structure were observed with  $K$  values between 3 and 7, whereas the most stable prediction (lowest standard deviation) was obtained with three groups ( $K = 3$ ). We therefore used the Q-matrix output of the three-subpopulation run for the structure-based association analysis.

### Structure-based association analysis

Owing to the clear population structure and an expectation of low familial relatedness because of the way the genotype collections were selected, we performed structured association tests rather than using a mixed-model approach (Yu et al. 2006) to control for type I errors caused by the population structure. Associations between the marker data and the seed quality traits were tested with the software package TASSEL 2 (<http://www.maizogenetics.net/>) based on the logistic regression approach of Pritchard et al. (2000) as modified by Thornsberry et al. (2001) to deal with quantitative traits. The response variable was the presence or absence of the SSR polymorphism, while the quantitative traits and the population structure (Q matrix) were used as independent variables. The test statistic  $\Lambda$  indicates the degree of association between individual polymorphisms and the respective trait. The null distribution of random markers was simulated by 1000 permutations of the quantitative trait data over all genotypes. Only markers with an allele frequency of 5% or greater were included in the association analysis. Probabilities of association ( $P$  values) for individual markers were calculated as the proportion of observed  $\Lambda$  greater than the maximum permuted  $\Lambda$ . Additionally, to account for type I error bias the  $P$  values were adjusted for multiple tests, using a procedure proposed by Whitt and Buckler (2003) based on the permuted  $P$  values of the randomly distributed genome-wide markers. The rescaled  $P$  value accounts for the proportion of random markers with a permuted  $P$  value less than or equal to 0.05. According to Thornsberry et al. (2001), the true test statistic probably lies somewhere between the rescaled  $P$  value and  $P(\Lambda)$ , since some of the random markers are probably truly associated with the trait. Therefore  $P(\Lambda)$  identifies markers with potential association to a given trait, while the rescaled  $P$  value is a more conservative test that identifies associations with the least likelihood of being false positives.

### LD analysis of trait-associated markers

The markers used for the regional association analysis

were derived from a *B. rapa* sequence corresponding to a single major QTL in *B. napus*. In the paleopolyploid *B. napus* genome, however, SSR primers often amplify multiple homoeologous loci, and these may be linked to homoeologous gene copies that are also associated with the trait of interest. Hence, levels of LD are expected to be somewhat underestimated by SSR allele data in *B. napus*, since homoplasmic alleles can be present at multiple loci. Therefore no presumption was made that two fragments amplified by the same primer combination must necessarily belong to the same locus. Instead we used TASSEL to analyze LD among pairs of amplicons from SSRs that were predicted to be adjacent based on the *B. rapa* sequence. The LD was calculated based on the squared allele frequency correlation ( $r^2$ ), while the significance of the LD between putative locus pairs was determined by Fisher's exact test. Pairs of alleles from adjacent loci with significant LD were used to reconstruct blocks showing strong local LD among groups of adjacent loci.

## Results

### Dark-seeded *B. napus* shows useful variation for seed fibre and phenolic compounds

Mean phenotype data from all genotypes used for the association analyses are given in Table S1, while a summary of the statistical variation in the diversity set, along with heritability values for seed colour and fibre compounds, is provided in Table 2. The 49 genotypes displayed significant variation for all seed traits including seed colour, which varied from a minimum visual light reflectance value of 7.65 (reddish brown) to a maximum of 9.55 (deep black). The minimum ADL content among the diversity panel was 4.75% of seed dry mass, which compares favourably with the lignin contents of some light-seeded *B. napus* genotypes (Wittkop et al. 2009). Considerable variation was also observed for the major phenolic acid fractions, which can represent a significant antinutritive meal component in *B. napus* seed meals. Interestingly, some of the dark-seeded accessions were found to be almost completely free of oligomeric proanthocyanidins. These data confirm the presence of genetic variation for seed coat thickness and associated phenolic and fibre compounds influencing seed colour and meal quality in dark-seeded *B. napus*.

As expected, the broad-sense heritability for seed colour ( $H^2 = 0.51$ ) was considerably lower than that for the three detergent fibre components, with the highest heritability ( $H^2 = 0.79$ ) being shown by ADL content. This observation reflects the high environmental influence on seed colour and underlines the comparative benefit of selecting directly for fibre content (e.g., via NIRS) in breeding for improved meal quality, rather than using seed colour as a selection marker.

### QTL-derived SSR markers show strong regional associations to seed colour and meal quality traits

Seven of the 10 in silico SSR primer combinations spanning the confidence interval of the major seed colour and meal quality QTL derived from yellow-seeded *B. napus* amplified fragments with significant associations ( $P \leq 0.05$ ) to one or more of the seed meal quality traits in the black-seeded diversity panel (Table 3, Fig. 1). For five SSR loci

**Table 2.** Minimum, mean, and maximum trait values for seed colour (visual light absorbance), acid detergent fibre (ADF), neutral detergent fibre (NDF), acid detergent lignin (ADL), major phenolic (phen.) acids, and proanthocyanidin (PA) fractions in a diversity panel of 49 dark-seeded winter *B. rapa* accessions, along with coefficient of variance (CV), root mean square error (RMSE), and broad-sense heritability ( $H^2$ ) estimates for seed colour and detergent fibre compounds.

	Seed colour	ADF (% DM)	NDF (% DM)	ADL (% DM)	Phen. acid 1 (mg/g)	Phen. acid 2 (mg/g)	Total phen. acids (mg/g DM)	Oligomeric PA 1 (mg/g DM)	Oligomeric PA 2 (mg/g DM)	Polymeric PA 7 (mg/g DM)	Total polymeric PA (mg/g DM)
Minimum	7.65	11.45	17.10	4.75	1.58	0.53	2.66	0.01	0.00	0.02	0.33
Mean	8.46	13.06	18.80	5.78	2.78	2.07	4.85	0.52	0.05	0.18	0.61
Maximum	9.55	15.38	21.32	7.27	5.38	3.25	7.52	1.25	0.15	0.54	1.79
CV	4.73	4.63	3.85	8.36	—	—	—	—	—	—	—
RMSE	0.40	0.60	0.72	0.49	—	—	—	—	—	—	—
$H^2$	0.51	0.76	0.74	0.79	—	—	—	—	—	—	—

**Note:** ANOVA could not be performed for phenolic compounds owing to a lack of repetitions. DM, dry mass.

mapping within a 2 cM region on the genetic map, the trait associations were also significant with rescaled  $P$  values, suggesting that these are unlikely to represent type I errors. The phenotypic distributions in genotypes containing the respective fragments from these SSRs are described in Fig. 2. Four of these markers showed highly significant associations ( $P \leq 0.01$ ). Three of the loci with strongly trait-associated markers, namely KBrH081N08-10 (232 bp fragment strongly associated with seed colour), KBrH081N08-12 (218 bp fragment strongly associated with seed ADL), and KBrB019I24-15 (230 bp fragment strongly associated with polymeric proanthocyanidin content), cover a physical distance of only 28 420 bp in the *B. rapa* sequence, while KBrB019I24-20 (199 bp fragment strongly associated with sinapine content) lies a further 17 259 bp downstream. This suggests that the genome region delineated by these four loci potentially harbours a gene, or genes, involved in determining the seed coat thickness, with consequent pleiotropic effects on seed coat fibre compounds, polymeric proanthocyanidin (condensed tannin) accumulation, and seed colour. A 218 bp fragment amplified by KBrB019I24-13 was also strongly associated with sinapine content. This locus lies around 100 kb further downstream in the physical map of *B. rapa* but co-localized with the above-mentioned loci in our genetic map.

**Positional candidate genes within the trait-associated sequence contig**

Gene annotations for the BAC clones spanning the QTL region are available from the Brassica Genome Gateway at <http://brassica.bbsrc.ac.uk/>. The chromosome region containing the most strongly trait-associated markers contains no known *transparent testa* genes, the collective term for genes with a major influence on seed coat thickness and (or) pigmentation in *Arabidopsis*. On the other hand, a small number of genes that are potentially involved in the biosynthesis of phenylpropanoids or other seed coat cell wall compounds are present in the *B. rapa* sequence near the most strongly trait-associated SSR marker sequences. Positions of potential positional and functional candidate genes in relation to the trait-associated markers are shown in Fig. 1. Putative functions of the most interesting candidate genes in this region are outlined in the Discussion.

**Local LD analysis reveals potential homoeologous loci with trait associations**

Pairwise LD was analyzed between different alleles from adjacent pairs of the SSR markers most closely associated with seed colour and fibre compounds, using the predicted marker order based on the available *B. rapa* genome sequence. Determination of marker pairs with the highest pairwise LD enabled allelic markers to be assigned to groups representing putative homoeologous loci. This strategy revealed two main blocks of markers showing strong local LD near the trait-associated markers (Fig. 3). One of these blocks comprised four markers that showed significant associations with seed colour, NDF, phenolic acids, and proanthocyanidin compounds, respectively, whereas the second group of three markers showed associations only with seed colour and NDF content. These two blocks presumably represent homoeologous loci with different phenotypic effects

**Table 3.** List of markers showing significant ( $P \leq 0.05$ ) allele–trait associations in population structure-based regional association analysis of seed colour, fibre components, and phenolic compounds in a set of 49 dark-seeded winter oilseed rape accessions.

Seed trait or compound	SSR marker	Allele size (bp) <sup>a</sup>	Frequency (%)	Permuted <i>P</i> value
Coat colour	KBrH081N08-2	222	26.5	26
	KBrH081N08-10	228	26.5	22
	<i>KBrH081N08-10</i>	232	59.2	5
Neutral detergent fibre (NDF)	KBrH081N08-2	222	26.5	34
	KBrH081N08-2	225	65.3	28
	KBrH081N08-10	228	26.5	32
	ENA21	251	40.8	45
Acid detergent fibre (ADF)	KBrH081N08-2	218	6.1	42
Acid detergent lignin (ADL)	<i>KBrH081N08-12</i>	218	87.8	8
Polymeric proanthocyanidin peak 7 (unidentified)	KBrH081N08-12	232	28.6	37
	<i>KBrB019I24-15</i>	230	6.1	3
	KBrH081N08-12	232	28.6	42
Total polymeric proanthocyanidins	KBrH081N08-12	232	28.6	42
Major phenolic acid 1 (predominantly sinapine)	<i>KBrB019I24-20</i>	199	12.2	5
	<i>KBrB019I24-13</i>	218	24.5	26
Major phenolic acid 2 (predominantly sinapoylglucose)	KBrH081N08-2	218	6.1	32
Total phenolic acids	KBrB019I24-20	199	12.2	48
	KBrB019I24-13	218	24.5	39

**Note:** All markers derive from a major QTL for seed colour and fibre content from a cross between yellow-seeded and black-seeded winter oilseed rape. The marker–trait associations in italics were also significant ( $P \leq 0.05$ ) with rescaled *P* values.

<sup>a</sup>Including 18 bp M13 tail sequence.

on seed coat characters, or alternatively they could represent different haplotypes of the major QTL on chromosome N9. Since the phase of the SSR markers is not known, however, the unambiguous identification of haplotypes is not possible from the currently available data.

Interestingly, three of the five SSR marker alleles with the strongest trait associations, namely KBrH081N08-12\_218 (218 bp allele associated with ADL content), KBrH081N08-2\_218 (218 bp allele associated with ADF and sinapoylglucose content), and KBrB019I24-15\_230 (230 bp allele associated with polymeric proanthocyanidin content), show no significant LD to other trait-associated markers. This lack of LD might result from homoplasious alleles from multiple loci that all influence the respective traits, or alternatively these markers could represent further homoeologous loci that express different genes or alleles.

## Discussion

### Linkage disequilibrium and trait associations

The resolution of association studies in plants depends greatly on the level of LD in the specific genome region(s) contributing to the trait, in the specific population being investigated. In *B. napus* few studies have been published describing the extent of LD. Data presented by Ecker et al. (2010) for genetically mapped genome-wide AFLP markers suggest that LD decays rapidly at genetic distances beyond 1 to 2 cM in modern winter oilseed rape cultivars with low seed erucic acid and glucosinolate content (00 or canola quality), and that LD between non-linked markers is very low. This is somewhat surprising considering the significant bottlenecks that have occurred during the breeding of 00-quality oilseed rape and the fact that *B. napus* exhibits a relatively high degree of selfing. On the other hand, the stable

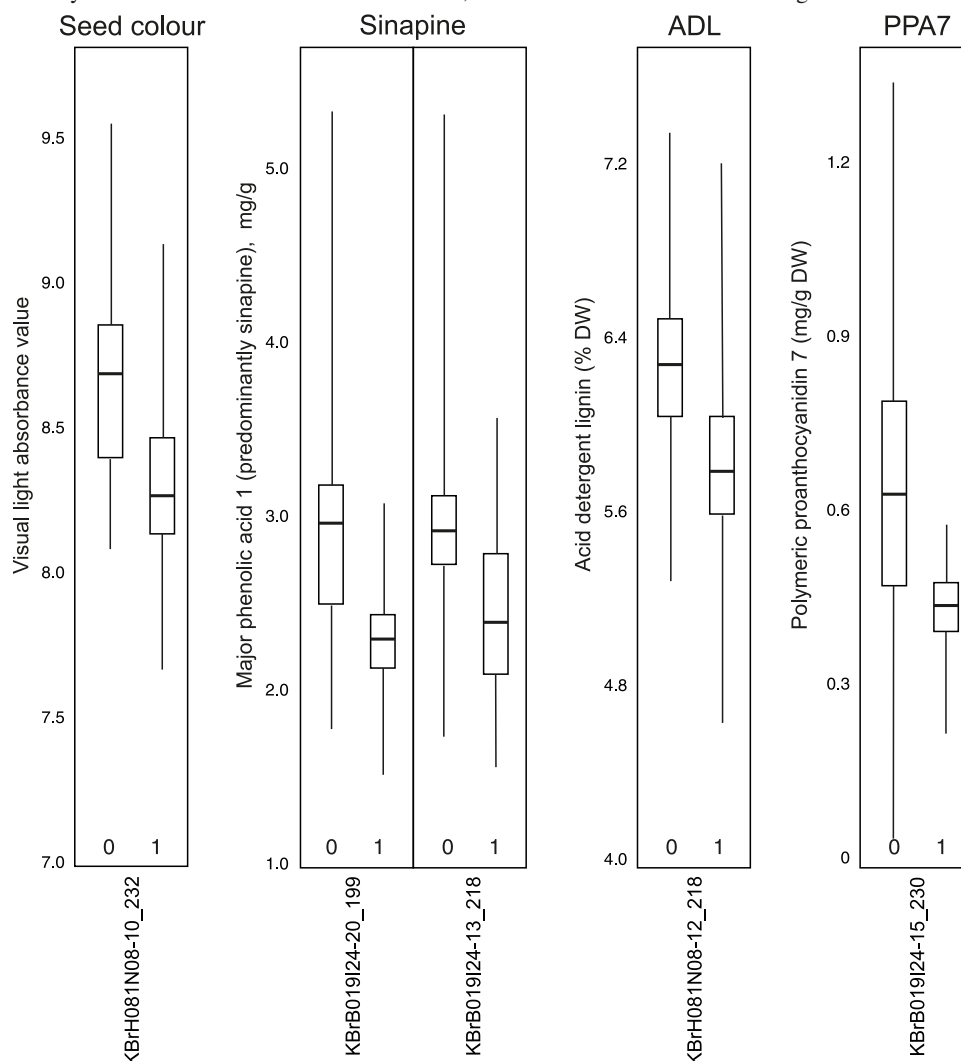
LD over short distances and its rapid decay over longer distances means that association mapping approaches with closely spaced markers should have a relatively high power of resolution compared with QTL mapping in segregating populations. The results of our work seem to support this presumption. Four SSR markers from an interval spanning less than 50 kb of chromosome A9 were found to be strongly associated with the seed coat-related traits we investigated. The significance of the marker–trait associations declined outside of this interval, indicating a decay of LD with the gene or genes influencing these traits.

### Classical QTL mapping versus association mapping

Conventional QTL mapping in biparental crosses between yellow-seeded and black-seeded parental lines identified a large QTL with strong effects on seed colour and fibre content in the chromosome region spanning the QTL; however, the resolution was comparatively poor, with confidence intervals spanning many centimorgans. Furthermore, alignment of the physical positions of the marker sequences in *B. rapa* with the genetic map positions in *B. napus* revealed potential rearrangements of marker order. These inconsistencies, and the unexpectedly high recombination frequencies in the QTL region, could be explained by imprecision of the genetic mapping. Another possible explanation could be chromosome rearrangements in the resynthesized *B. napus* line from which the yellow-seeded mapping parent was derived. Resynthesized rapeseed is particularly prone to homoeologous non-reciprocal translocations (HNRTs; Udall et al. 2005), which in turn can complicate the genetic mapping of affected chromosome segments. HNRTs may also cause replacement of functional alleles with non-functional alleles from homoeologous gene loci, which might explain the relatively common appearance of yellow-seeded phenotypes in



**Fig. 2.** Box-whisker plots describing trait distributions in the presence (1) or absence (0) of five SSR markers with significant associations (rescaled  $P$  value  $\leq 0.05$ ) to seed traits in a set of 49 genetically diverse winter oilseed rape genotypes. Boxes cover the interquartile range, median scores are shown by the thick horizontal lines in the boxes, and whiskers cover the remaining variation.



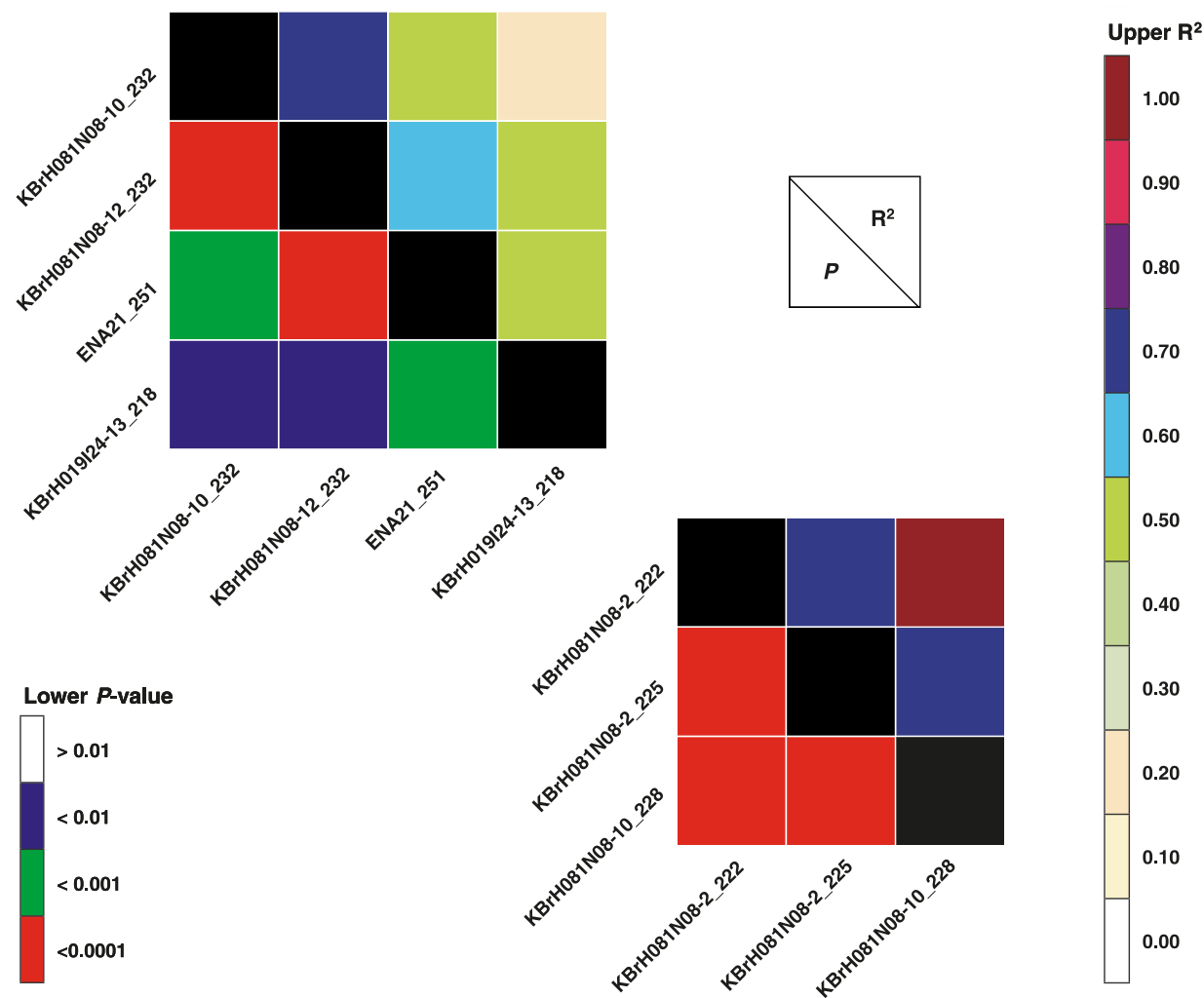
progenies from interspecific crosses among *Brassica* species. Alternatively, the apparent inconsistencies between the marker order in the *B. napus* genetic map and that in the *B. rapa* genome sequence might be due to local chromosome rearrangements between the respective A genomes of *B. rapa* and *B. napus*. A preliminary fingerprinting analysis of *B. napus* BAC clones corresponding to the QTL region revealed apparent duplications, deletions, and rearrangements of marker order in *B. napus* in at least one homoeologous locus compared with the available *B. rapa* sequence. These problems underline the difficulties of genetic mapping in a paleopolyploid genome like that of *B. napus*, particularly in crosses involving resynthesized parental lines. On the other hand, the apparent success of the regional association mapping approach confirms the comparatively high resolution of LD mapping and its usefulness for delineation of candidate gene regions.

#### Seed colour, seed coat thickness, and phenolic compounds in *B. napus*

In *B. napus* all yellow-seeded lines also show a large re-

duction in fibre compounds corresponding to a reduction in seed coat thickness (Wittkop et al. 2009). On the other hand, dark-seeded *B. napus* also exhibits an unexpectedly high amount of variation for seed coat thickness and fibre content. The major physiological change associated with the reduced fibre phenotype in both yellow and dark seeds is a reduction in secondary thickening of the palisade cell walls in the outer seed integument during the middle stages of seed development. This accounts for the strong correlation between seed colour and ADL content (Wittkop et al. 2009), since ADL in *B. napus* seeds is thought to be largely composed of lignin and phenolic lignin precursors laid down during secondary thickening in seed coat cell walls. The associated influence on the accumulation of a major polymeric proanthocyanidin compound could be caused by the common precursors, such as *p*-coumarate, in the biochemical pathways leading to lignin and pigment synthesis (Whetten et al. 1998). On the other hand, it is possible that a common regulatory factor influences both pathways or simply that a spatial reduction in seed coat thickness causes a quantitative reduction in pigment accumulation.

**Fig. 3.** Overview of linkage disequilibrium among groups of adjacent SSR alleles associated with seed coat traits. The two groups may represent two homoeologous loci that show associations of different alleles to meal quality traits, or alternatively they could be haplotypes of different alleles from the same locus. The first block (top left) comprises four markers that show significant associations with seed colour, neutral detergent fibre (NDF), phenolic acids, and proanthocyanidin compounds, respectively, whereas the second group of three markers (bottom right) show associations only with seed colour and NDF content.



**Candidate genes for seed coat fibre and phenolic compounds**

One of the most interesting positional candidate genes present in the *B. rapa* sequence near the most strongly trait-associated SSR marker sequences is At3g17310, which encodes a protein showing similarity to the domains-rearranged methyltransferase enzyme DRM2. Owing to the similarity to DRM2, the predicted function of At3g17310 is in methylation. Since several methylation reactions occur during the biosynthesis of lignin and its precursors, such genes are known to play an important role. In the *B. rapa* genome sequence covering the region of interest on chromosome 9, an ortholog of At3g17310 is located approximately 23 kb downstream of the marker KBrH081N08-12 and only around 2.5 kb upstream of marker KBrB019I24-15. In *Arabidopsis* this gene has weak absolute expression levels but is most strongly expressed in seeds during the middle stages of seed development (data from the Arabidopsis eFP Browser at <http://bbc.botany.utoronto.ca/>; Winter et al. 2007), corresponding to the expected tissue and time point of expression

for an effect on seed coat compounds. The expression is considerably stronger in the seed coat than in the embryo (data from <https://www.genevestigator.com/>; Hruz et al. 2008), which would be expected of a gene influencing seed coat cell wall thickening. Interestingly, the same gene also shows elevated expression in xylem and cork tissue of *Arabidopsis* when secondary thickening of hypocotyls is induced (Arabidopsis eFP Browser; microarray data from C. Dubos, University of Oxford, UK). This strongly indicates a potential role in secondary cell wall thickening and lignification.

Coincidentally, Shen et al. (2002) described an *S*-adenosyl-L-methionine synthetase 3 gene (*SAMS3*, At3g17390; also known as methionine adenosyltransferase 4 (*MAT4*) or methionine over-accumulator 3 (*MOT3*)) whose mutant exhibits elevated methionine levels and a simultaneous reduction in lignin accumulation. Since lignification consumes relatively large amounts of *S*-adenosyl methionine, reduced lignification can lead to an increase in free methionine. If this occurs in seeds then it is reasonable to expect that the free

methionine might be rechannelled into methionine-rich storage proteins. Such a mechanism would be a feasible biochemical explanation for the negative correlation of seed protein content to seed fibre content and seed colour described by Wittkop et al. (2009). According to Shen et al. (2002), *SAMS3* probably interacts with a methyltransferase involved in lignin biosynthesis. In *Arabidopsis*, *SAMS3* is located almost directly adjacent to *At3g17310*, raising the potential for co-expression and interaction. Furthermore, the gene expression profiles of *At3g17310* and *At3g17390* show similar patterns in *Arabidopsis* seeds (data from <https://www.genevestigator.com/>). In the available *B. rapa* sequence no ortholog of *SAMS3* is present in the region colinear to the major QTL from chromosome A9, although a number of genes that flank *SAMS3* in *Arabidopsis* are found. Re-sequencing of the corresponding region could confirm whether a copy of *SAMS3* is present in *B. napus* and whether a deletion of this gene might be involved in variation for seed coat thickness.

Another potential positional and functional candidate gene based on microsynteny of the sequenced *B. rapa* chromosome region to *Arabidopsis* is *CESA9* (*At2g21770*), a member of the cellulase synthase gene family expressed during mid to late seed development. A number of genes with key roles in phenylpropanoid biosynthesis have expression patterns highly correlated to that of *CESA9* in *Arabidopsis* (data from the *Arabidopsis* Expression Angler tool; see Toufighi et al. 2005), suggesting a potential role of *CESA9* in regulating phenylpropanoid accumulation. These co-regulated genes include the seed-specific sinapoylglucose accumulator gene *SNG2* (*At5g09640*), the UDP-glucosyltransferase gene *UGT76E2* (*At5g59590*), and the cytochrome P450-dependent gene *CYP72A9* (*At3g14630*). The first of these genes, *SNG2*, influences the biosynthesis of sinapate esters in seeds, and reduced expression causes a reduction in sinapine accumulation (Shirley et al. 2001). The second gene with an expression pattern related to that of *CESA9*, *UGT76E2*, encodes a key enzyme in the biosynthesis of flavonols and particularly influences levels of quercetin and dihydroquercetin; these two flavonoid compounds were identified by Marles et al. (2003) as two of the most important metabolites associated with differences in seed pigmentation in *Brassica carinata*. On the other hand, the strongly seed-specific gene *CYP72A9* is a direct interaction partner with the *p*-coumarate 3-hydroxylase gene *CYP98A3*, commonly known as *C3H*, which plays a central role in phenylpropanoid biosynthesis. Expression changes in *CYP72A9* can therefore be expected to influence *C3H* activity and consequently affect the quantities of phenolic compounds in the seed. While these genes themselves are not implicated as positional candidates in the QTL region we studied, the fact that they are implicated in important aspects of seed phenylpropanoid biosynthesis raises the possibility that *CESA9* might play a role in regulating their expression in *Brassica* seed coats.

The *B. rapa* chromosome region containing the markers associated to *B. napus* seed phenylpropanoid compounds shows conserved macrosynteny to the *Arabidopsis* chromosome region containing *CESA9*, although a copy of this gene is not found in the *B. rapa* genome sequence. On the other hand, orthologs of *At2g21730* and *At2g21890*, which

closely flank *CESA9* in *Arabidopsis*, are present in the *B. rapa* sequence corresponding to the major *B. napus* QTL for seed colour and fibre compounds. In the present study the markers KBrB019I24-13 and KBrB019I24-20 showed strong associations to sinapine content. The first of these markers is directly adjacent to the *At2g21730* ortholog in the *B. rapa* genome sequence. Furthermore, fingerprinting analysis of *B. napus* BAC clones corresponding to the QTL region suggested that KBrB019I24-20 is considerably closer to KBrB019I24-13 in black-seeded *B. napus* than it is in the *B. rapa* reference sequence (unpublished data). This suggests that the direct neighbourhood of these two markers in *B. napus* may well harbour a locus with a strong influence on seed phenolic compounds. The results from the association analysis indicate that this locus could act independently of the above-mentioned locus for seed colour and fibre content. The fact that the 8 kb interval between the *At2g21710* and *At2g21890* orthologs in the *B. rapa* sequence does not contain *CESA9* could be explained by a deletion of this gene in *B. rapa* compared with the corresponding chromosome region in *B. napus*. Seeds of *B. rapa* are often brown or yellow, which is why this species has often been used as a donor for the yellow-seed, low fibre trait into *B. napus*. Comparison of gene content and polymorphisms between *B. rapa* and *B. napus* in the seed meal quality-associated chromosome region we have delineated in the present study will give further insight into potential gene deletions or sequence polymorphisms that cause the observed trait variations. Ultimately this should help to identify the responsible gene or genes along with markers for breeding of oilseed rape with improved meal quality. The potential candidate genes identified in this study can now be used to directly study associations between sequence diversity, or gene presence-absence polymorphisms, and antinutritive seed phenylpropanoid compounds. Re-sequencing of these genes in genetically diverse *B. napus* accessions could potentially identify further useful variation for breeding of oilseed rape varieties with reduced contents of antinutritional fibre and phenolic compounds.

## Acknowledgements

This work was funded by the German Federal Ministry for Education and Research BMBF within the project GABI-YelLowSin (grant No. 0313703A). We thank KWS Saat AG for providing seed materials from field trials, and Frank Breuer (KWS Saat AG) and Jörg Schondelmaier (SaatenUnion Biotec GmbH) for supplying additional marker data used in the genetic mapping. Svetlana Renner, Nelly Weis, and Liane Renno provided excellent technical assistance.

## References

- Aranzana, M.J., Kim, S., Zhao, K., Bakker, E., Horton, M., Jakob, K., et al. 2005. Genome-wide association mapping in *Arabidopsis* identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes. *PLoS Genet.* **1**(5): e60. doi:10.1371/journal.pgen.0010060. PMID:16292355.
- Badani, A.G., Snowdon, R.J., Baetzel, R., Lipsa, F.D., Wittkop, B., Horn, R., et al. 2006. Colocalization of a partially dominant gene for yellow seed colour with a major QTL influencing acid detergent fibre (ADF) content in different crosses of oilseed rape

- (*Brassica napus*). Genome, **49**(12): 1499–1509. doi:10.1139/G06-091. PMID:17426765.
- Berg, E.S., and Olaisen, B. 1994. Hybrid PCR sequencing: sequencing of PCR products using a universal primer. Biotechniques **17**(5): 896–901. PMID:7840970.
- Bresegghello, F., and Sorrells, M.E. 2006. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. Crop Sci. **46**(3): 1323–1330. doi:10.2135/cropsci2005.09-0305.
- Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, **12**: 13–15.
- Ecke, W., Clemens, R., Honsdorf, N., and Becker, H.C. 2010. Extent and structure of linkage disequilibrium in canola quality winter rapeseed (*Brassica napus* L.). Theor. Appl. Genet. **120**(5): 921–931. doi:10.1007/s00122-009-1221-0. PMID:19953219.
- Flint-Garcia, S.A., Thornsberry, J.M., and Buckler, E.S., IV. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. Annu. Rev. Plant Biol. **54**(1): 357–374. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134907. PMID:14502995.
- Fu, F.Y., Liu, L.Z., Chai, Y.R., Chen, L., Yang, T., Jin, M.Y., et al. 2007. Localization of QTLs for seed color using recombinant inbred lines of *Brassica napus* in different environments. Genome, **50**(9): 840–854. doi:10.1139/G07-068. PMID:17893725.
- Garris, A.J., McCouch, S.R., and Kresovich, S. 2003. Population structure and its effect on haplotype diversity and linkage disequilibrium surrounding the *xa5* locus of rice (*Oryza sativa* L.). Genetics, **165**(2): 759–769. PMID:14573486.
- Hasan, M., Friedt, W., Pons-Kühnemann, J., Freitag, N.M., Link, K., and Snowdon, R.J. 2008. Association of gene-linked SSR markers to seed glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*). Theor. Appl. Genet. **116**(8): 1035–1049. doi:10.1007/s00122-008-0733-3. PMID:18322671.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorf, F., Bleuler, S., Oertle, L., et al. 2008. Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. Adv. Bioinformatics, 2008: 420747. doi:10.1155/2008/420747. PMID:19956698.
- Marles, M.A.S., Gruber, M.Y., Scoles, G.J., and Muir, A.D. 2003. Pigmentation in the developing seed coat and seedling leaves of *Brassica carinata* is controlled at the dihydroflavonol reductase locus. Phytochemistry, **62**(5): 663–672. doi:10.1016/S0031-9422(02)00488-0. PMID:12620317.
- Matthäus, B. 1998. Isolation, fractionation and HPLC analysis of neutral phenolic compounds in rapeseeds. Nahrung, **42**(02): 75–80. doi:10.1002/(SICI)1521-3803(199804)42:02<75::AID-FOOD75>3.3.CO;2-6.
- Naczki, M., Amarowicz, R., Pink, D., and Shahidi, F. 2000. Insoluble condensed tannins of canola/rapeseed. J. Agric. Food Chem. **48**(5): 1758–1762. doi:10.1021/jf9908401. PMID:10820091.
- Österberg, M.K., Shavorskaya, O., Lascoux, M., and Lagercrantz, U. 2002. Naturally occurring indel variation in the *Brassica nigra* *COL1* gene is associated with variation in flowering time. Genetics, **161**(1): 299–306. PMID:12019243.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, **155**(2): 945–959. PMID:10835412.
- Remington, D.L., Thornsberry, J.M., Matsuoka, Y., Wilson, L.M., Whitt, S.R., Doebley, J., et al. 2001. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **98**(20): 11479–11484. doi:10.1073/pnas.201394398. PMID:11562485.
- Seyis, F., Snowdon, R.J., Lühs, W., and Friedt, W. 2003. Molecular characterisation of novel resynthesised rapeseed (*Brassica napus* L.) lines and analysis of their genetic diversity in comparison to spring rapeseed cultivars. Plant Breed. **122**(6): 473–478. doi:10.1111/j.1439-0523.2003.00859.x.
- Shen, B., Li, C., and Tarczynski, M.C. 2002. High free-methionine and decreased lignin content result from a mutation in the *Arabidopsis* *S*-adenosyl-L-methionine synthetase 3 gene. Plant J. **29**(3): 371–380. doi:10.1046/j.1365-313X.2002.01221.x. PMID:11844113.
- Shirley, A.M., McMichael, C.M., and Chapple, C. 2001. The *sng2* mutant of *Arabidopsis* is defective in the gene encoding the serine carboxypeptidase-like protein sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase. Plant J. **28**(1): 83–94. doi:10.1046/j.1365-313X.2001.01123.x.
- Sun, B., Leandro, M.C., de Freitas, V., and Spranger, M.I. 2006. Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. J. Chromatogr. A, **1128**(1–2): 27–38. doi:10.1016/j.chroma.2006.06.026. PMID:16815428.
- Thornsberry, J.M., Goodman, M.M., Doebley, J., Kresovich, S., Nielsen, D., and Buckler, E.S.. 2001. *Dwarf8* polymorphisms associate with variation in flowering time. Nat. Genet. **28**(3): 286–289. doi:10.1038/90135. PMID:11431702.
- Toufighi, K., Brady, S.M., Austin, R., Ly, E., and Provart, N.J. 2005. The Botany Array Resource: e-Northern, Expression Angling, and promoter analyses. Plant J. **43**(1): 153–163. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02437.x. PMID:15960624.
- Udall, J.A., Quijada, P.A., and Osborn, T.C. 2005. Detection of chromosomal rearrangements derived from homeologous recombination in four mapping populations of *Brassica napus* L. Genetics, **169**(2): 967–979. doi:10.1534/genetics.104.033209. PMID:15520255.
- Whetten, R.W., MacKay, J.J., and Sederoff, R.R. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. **49**(1): 585–609. doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.585. PMID:15012247.
- Whitt, S.R., and Buckler, E.S. 2003. Using natural allelic diversity to evaluate gene function. In Plant functional genomics: methods and protocols. Edited by E. Grotewald. Humana Press, Totowa, N.J. pp. 123–140.
- Wilson, L.M., Whitt, S.R., Ibáñez, A.M., Rocheford, T.R., Goodman, M.M., and Buckler, E.S. 2004. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. Plant Cell, **16**(10): 2719–2733. doi:10.1105/tpc.104.025700. PMID:15377761.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., Provart, N.J., and Baxter, I. 2007. An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. PLoS One, **2**(1): e718. doi:10.1371/journal.pone.0000718. PMID:17684564.
- Wittkop, B., Snowdon, R.J., and Friedt, W. 2009. Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe. Euphytica, **170**(1–2): 131–140. doi:10.1007/s10681-009-9940-5.
- Xiao, S., Xu, J., Li, Y., Zhang, L., Shi, S., Shi, S., et al. 2007. Generation and mapping of SCAR and CAPS markers linked to the seed coat color gene in *Brassica napus* using a genome-walking technique. Genome, **50**(7): 611–618. doi:10.1139/G07-044. PMID:17893738.
- Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W.H., Vroh Bi, I., Yamasaki, M., Doebley, J.F., et al. 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. Nat. Genet. **38**(2): 203–208. doi:10.1038/ng1702. PMID:16380716.
- Yuan, Y.X., Wu, J., Sun, R.F., Zhang, X.W., Xu, D.H., Bonnema, G., and Wang, X.W. 2009. A naturally occurring splicing site mutation in the *Brassica rapa* *FLC1* gene is associated with variation in flowering time. J. Exp. Bot. **60**(4): 1299–1308. doi:10.1093/jxb/erp010. PMID:19190098.



Zhao, J., Paulo, M.J., Jamar, D., Lou, P., van Eeuwijk, F., Bonnema, A.B., et al. 2007a. Association mapping of leaf traits, flowering time, and phytate content in *Brassica rapa*. *Genome*, **50**(10): 963–973. doi:10.1139/G07-078. PMID:18059559.

Zhao, K., Aranzana, M.J., Kim, S., Lister, C., Shindo, C., Tang, C., et al. 2007b. An *Arabidopsis* example of association mapping in structured samples. *PLoS Genet.* **3**(1): e4. doi:10.1371/journal.pgen.0030004. PMID:17238287.

### **3.3 New NIRS calibrations for fibre fractions reveal a broad genetic variation in *Brassica napus* seed quality**

Benjamin Wittkop, Rod J. Snowdon, and Wolfgang Friedt

*J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 2248-2256.

# New NIRS Calibrations for Fiber Fractions Reveal Broad Genetic Variation in *Brassica napus* Seed Quality

Benjamin Wittkop, Rod J. Snowdon, and Wolfgang Friedt\*

Department of Plant Breeding, IFZ Research Centre for Biosystems, Land Use and Nutrition, Justus Liebig University, Heinrich-Buff-Ring 26-32, 35392 Giessen, Germany

**ABSTRACT:** Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) calibrations were developed for the estimation of neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and acid detergent lignin (ADL) in intact seeds of oilseed rape (*Brassica napus*). A set of 338 diverse winter oilseed rape genotypes showing broad variation for seed color was used as a basis for the new calibrations. Different calibrations were generated for 10 or 1 mL seed volumes, respectively. In both seed volumes good coefficients of determination for external validation ( $R^2$ ) of the calibrations were obtained for ADL, the major antinutritional fiber fraction in oilseed rape meal, and adequate calibrations for NDF and ADF. Evaluation of diverse *B. napus* germplasm with the new calibrations revealed a surprisingly broad variation in contents of ADL in dark-seeded oilseed rape. The ability to use NIRS for efficient selection of low-fiber genotypes, irrespective of seed color, represents an important breakthrough in breeding for improved nutritional quality of seed extraction meals from oilseed rape.

**KEYWORDS:** oilseed rape (*Brassica napus*), near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), acid detergent lignin (ADL), seed color

## INTRODUCTION

World production of oilseed rape and canola (*Brassica napus*) has risen dramatically during the past two decades because of increasing demands for high-quality vegetable oil and biodiesel. The seed meal residue remaining after oil extraction is an important byproduct used for livestock feeding, having a high protein content of around 40% combined with comparatively high concentrations of essential sulfur amino acids such as methionine and cysteine. On the other hand, however, the use of oilseed rape seed meals in animal nutrition is still limited due to several antinutritive or nonenergetic components, particularly in the feeding of monogastric animals (pigs and poultry). In particular, the small seed size and relatively high proportion of seed coat in the meal lead to high concentrations of the fiber fractions, such as neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and acid detergent lignin (ADL). Animal nutritionists suggest that ADL, consisting largely of lignin-related phenolic compounds, is the most nutritionally relevant fiber fraction. The poor digestibility of ADL in both ruminant and monogastric animals leads to a reduction in energy uptake from high-ADL meals.<sup>1</sup> Whereas dehulling of *B. napus* seeds leads to a significant reduction of fiber compounds, and particularly ADL, in oilseed rape meal,<sup>1,2</sup> a more economically viable option for reduction of antinutritive fiber is breeding for reduced seed coat thickness. Reducing the seed coat contribution to the seed volume is also expected to result in an increased proportion of oil and protein in the seed, leading to an improvement in overall seed value.<sup>3–5</sup>

To date, most efforts to reduce fiber content in oilseed rape seed meal have focused on the use of the yellow seed trait as a selection marker for reduced seed coat thickness. However, seed color is known to be environmentally sensitive, and it can be difficult to develop pure-breeding varieties. On the other hand, we have demonstrated that considerable useful variation

for seed fiber content also exists within dark-seeded *B. napus*, which could represent an important resource to breed for improved meal quality.<sup>6</sup> A prerequisite is the establishment of effective selection methods to rapidly measure fiber fractions in breeding materials. Standard wet chemistry analytical techniques are currently used to determine contents of NDF, ADF, and ADL; however, such methods are costly, time-consuming, and destructive, making them unsuitable for early breeding generations for which only small seed quantities are available from breeding lines.

Near-infrared reflectance spectroscopy (NIRS) is a high-throughput analytical technique that is routinely used to estimate numerous quality components for different agricultural crops.<sup>7</sup> In oilseed rape and canola breeding programs NIRS is commonly used for the estimation of important seed quality characteristics such as oil, protein, and glucosinolates contents.<sup>8</sup> Font et al.<sup>9</sup> reported on the possibility to estimate ADF in oilseed rape via NIRS; however, the method has not yet been reported for measurement of other fiber fractions, particularly ADL, in *B. napus*. On the other hand, NIRS has been widely reported to be an efficient analytical method for the screening of different cereal crop species and forage grasses for the rapid prediction of fiber fractions.<sup>10</sup>

In this study we developed new NIRS calibrations for the three major seed fiber fractions for use as a high-throughput, nondestructive selection tool to select oilseed rape and canola breeding lines with improved seed meal quality. Screening of genetically diverse winter oilseed rape populations with the new

**Received:** December 2, 2011

**Revised:** January 27, 2012

**Accepted:** February 1, 2012

**Published:** February 1, 2012

calibrations uncovered a broad range of phenotypic variation for seed fiber in black-seeded progenies.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant Material.** A set of 338 genetically diverse winter oilseed rape genotypes from several sources was used for the reference analysis and development of NIRS calibration for seed fiber fractions. The genotypes were divided into subsets for the calibration (289 and 200 seed samples for macro- and microcuvettes, respectively) and the external validation (49 seed samples for macrocuvettes and 40 samples for microcuvettes) in two different seed volumes. The difference in sample numbers for the two seed volumes was because the microcuvette calibration was developed later than the macrocuvette calibration and for 98 samples no remaining seeds were available for generation of microcuvette NIRS spectra. A total of 197 accessions were supplied by the German breeding companies NPZ Lembke (Hohenlieth), KWS Saat (Einbeck), and Deutsche Saatveredelung (Lippstadt) from their commercial breeding programs, whereas the remaining 141 genotypes derived from populations generated by Justus Liebig University, Giessen. Because light seed color is reported to be associated with low fiber contents in *B. napus* seeds,<sup>11</sup> yellow- and brown-seeded genotypes from different genetic backgrounds were also included in the screening panel. To account for environmental variation in seed coat characteristics, the seeds chosen for the screening panel were derived from diverse field locations in different years.

**Reference Analysis for Fiber Fractions.** Reference values for development of NIRS calibrations were generated by wet chemistry analysis of fiber fractions according to the methods of Van Soest<sup>12</sup> and Goering and Van Soest.<sup>13</sup> After defatting of ground seeds with petroleum ether and oven-drying, the samples were boiled in either a neutral or acid detergent solution for extraction of NDF and ADF, respectively. Extraction and boiling were carried out in 600 mL beakers on a six-position serial hot plate (Gerhardt, Germany), with evaporation prevented using 500 mL round-bottomed flasks cooled with circulating cold water. The insoluble fraction after boiling was separated in a 50 mL filter crucible, washed, dried, and weighed, allowing fiber fractions to be determined in percentage of dry weight (% DW). The quantities of remaining dry matter represent the contents of either NDF (comprising mainly hemicellulose, cellulose, and lignin-related compounds) or ADF (cellulose, lignin, and lignin-N bonds). After determination of ADF, this fraction was further treated with 72% sulfuric acid to measure ADL (comprising lignin-related phenolic compounds). Determination of each sample was repeated (two replications) and averaged. On the basis of the NDF, ADF, and ADL fractions, it is possible to determine the approximate contents of each of the three major dietary fiber components hemicellulose (NDF - ADF), cellulose (ADF - ADL), and lignin (ADL).

**NIRS Spectra Sampling.** Seed samples harvested from the field were cleaned and filled into ring cups with a sample volume of either 10 mL macrocuvettes (approximately 500 seeds) or 1 mL microcuvettes (approximately 50 seeds). All samples were scanned in a NIRSystems 6500 spectrometer (FOSS NIRSystems Inc., Silver Spring, MD) using an autocup sampler. Spectra were acquired in reflectance mode at 2 nm intervals over a wavelength range from 400 to 2500 nm (visible and NIR regions) and reported as  $\log(1/R)$  spectra, where a ceramic plate is used as an internal white standard. Contents of seed oil, protein, and glucosinolates were derived using a calibration from VDLUFA NIRS-Qualitätssicherung GmbH (Kassel, Germany).<sup>14</sup> An in-house NIRS calibration for seed color was used.<sup>15</sup> This calibration was developed with a large panel of rapeseed genotypes segregating for seed color, using reference values for visual light absorbance assessed by the digital-optical image analysis system MARVIN (GTA Sensorik, Neubrandenburg, Germany). The calibration describes seed color as a visual light absorbance value on a scale from 1 (light) to 9 (dark).<sup>15</sup> Bright yellow seeds generally give a value of 2–3, whereas black seeds show values of 8–9.

**NIRS Calibrations for Fiber Fractions.** NIRS calibrations for NDF, ADF, and ADL were performed using WINISI II v.1.50 software (Infrasoft International, LLC, Port Matilda, PA). The modified partial least-squares regression (MPLS) method was used to correlate reference values for NDF, ADF, and ADL against NIR spectra from only the near-infrared spectral region (1100–2500 nm), to avoid spectral interference with seed color. Calibration equations were calculated with transformed raw optical data ( $\log 1/R$ , where  $R$  is reflectance) using the standard normal variate command “SNV and detrend” with different derivatives and smoothing steps as described by Barnes et al.<sup>16</sup> For both seed volumes the following mathematical treatment was used, as described by Shenk and Westerhaus:<sup>17</sup> derivative order = 2; segment of the derivatives (gap) = 5; first smooth = 5; second smooth = 2.

Cross-validation and principal component analyses (PCA) were performed on the calibration set, formed by 289 rapeseed samples for macrocuvettes and 200 seed samples for microcuvettes, to determine the optimal number of terms for the calibration equation and to identify chemical (T) and spectral (H) outliers. The H-outlier samples, identified with PCA before calibration equations were computed, are spectrally different from other samples in the calibration population and have a standardized  $H$  value of  $>3.0$  (Mahalanobis distance). The T-outliers are samples with large residuals ( $T$  value  $> 2.5$ ) and represent a higher discrepancy in reference values and spectrum compared with other relationships in the calibration population. A total of seven cross-validation groups and three outlier elimination steps were employed for both seed volumes.

**Validation of NIRS Equations.** Besides the cross-validation performed during the calibration procedure, an external validation of calibration equations with validation sets was carried out to assess the accuracy and precision of newly developed calibrations for NDF, ADF, and ADL. The validation sets are composed of 49 independent seed samples (every 7th sample from 338) for the 10 mL macrocuvettes and 40 samples (every 6th sample from 240) for the 1 mL microcuvettes. These samples were excluded from the development of the calibration. Calibration quality was evaluated by calculating the coefficient of determination ( $R^2$ ) and the RPD, defined as the ratio of standard deviation (SD) of validation samples to the standard error of prediction (SEP). Finally, the ratio of SEP to the standard error of laboratory (SEL) was calculated to compare the prediction error of the NIRS calibration in relation to the reference method.<sup>18</sup>

**Evaluation of Calibrations by Screening in Breeding Populations.** The newly developed NIRS calibrations were used to evaluate seed fiber compounds in comparison to other seed quality traits in two different segregating winter oilseed rape doubled-haploid (DH) populations. The population YE2-DH consists of 166 DH lines derived from a cross between the black-seeded inbred line ‘Express 617’ and the yellow-seeded inbred line ‘1012-98’. This population therefore shows a strong segregation for seed color. Both ‘Express 617’ and ‘1012-98’ have “double-low” seed quality (low erucic acid and glucosinolate contents). The population ExV8-DH consists of 250 DH lines from the cross between ‘Express 617’ and the black-seeded line ‘V8’, which has high erucic acid and glucosinolate contents.<sup>19</sup> Seed samples from YE2-DH and ExV8-DH lines were collected from field trials at six different locations throughout Germany between 2003 and 2009. NIRS estimates of seed quality traits were used for calculations of phenotypic and genotypic variances as well as for correlation analyses.

**Statistical Analysis of Seed Quality Trait Data.** Analysis of variance for seed quality traits estimated by NIRS in seed samples from different years and environments was performed with the PASW Statistics v. 18.0.2 program (IBM Software, SPSS Inc.). On the basis of the trial design the locations were considered as replicates ( $r$ ), the years as environments ( $e$ ), and the individual genotypes by year interactions as random; the broad sense heritability ( $h^2$ ) for each trait was calculated with the formula

$$h^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_e^2 / r + \sigma_{ge}^2 / e + \sigma_g^2)$$

**Table 1. Cross-Validation Statistics of NIRS Calibrations (Spectral Range 1100–2500 nm; MPLS, SNV, and Detrend 2,5,5,2) for the Seed Fiber Fractions Neutral Detergent Fiber (NDF), Acid Detergent Fiber (ADF), and Acid Detergent Lignin (ADL) Estimated by NIRS in 10 mL Macrocvettes and 1 mL Microcvettes, Respectively**

fiber fraction	mL	N <sup>a</sup>	range (% DW)	SD <sup>b</sup>	SECV <sup>c</sup>	R <sup>2</sup> <sub>cv</sub> <sup>d</sup>	SEL <sup>e</sup>	SD/SECV	SECV/SEL
NDF	10	278	9.25–23.44	2.74	1.67	0.61	0.71	1.64	2.36
ADF	10	280	5.87–17.91	2.49	1.13	0.79	0.64	2.20	1.75
ADL	10	275	0.85–11.56	2.00	0.80	0.82	0.62	2.49	1.29
NDF	1	196	9.68–23.44	2.56	1.66	0.54	0.71	1.54	2.35
ADF	1	194	5.35–17.57	2.51	1.07	0.81	0.64	2.34	1.67
ADL	1	193	0.85–11.56	2.19	0.83	0.85	0.62	2.65	1.33

<sup>a</sup>N = number of seed samples used for calibration. <sup>b</sup>SD = standard deviation for reference values. <sup>c</sup>SECV = standard error of cross-validation. <sup>d</sup>R<sup>2</sup><sub>cv</sub> = coefficient of determination of cross-validation. <sup>e</sup>SEL = standard error of laboratory (reference analyses).

**Table 2. Results of the External Validation of NIRS Calibrations for the Seed Fiber Fractions Neutral Detergent Fiber, Acid Detergent Fiber, and Acid Detergent Lignin Estimated by NIRS in 10 mL Macrocvettes and 1 mL Microcvettes, Respectively**

fiber fraction	N <sup>a</sup>	mL	range (% DW) <sup>b</sup>	mean (% DW) <sup>b</sup>	SD <sup>c</sup>	SEP <sup>d</sup>	R <sup>2</sup> <sup>e</sup>	RPD <sup>f</sup>	SEL <sup>g</sup>	SEP/SEL
NDF	49	10	10.44–19.70	15.58	2.52	1.55	0.62	1.62	0.71	2.19
ADF	49	10	5.35–16.10	10.75	2.58	1.42	0.70	1.82	0.64	2.20
ADL	49	10	1.16–9.13	4.64	2.16	0.96	0.81	2.26	0.62	1.54
NDF	40	1	10.67–19.70	15.01	2.62	1.81	0.53	1.44	0.71	2.57
ADF	40	1	6.49–15.89	10.40	2.40	1.19	0.76	2.03	0.64	1.85
ADL	40	1	4.34–8.20	4.34	1.94	0.92	0.78	2.12	0.62	1.47

<sup>a</sup>N = number of seed samples used for calibration. <sup>b</sup>Range and mean from reference values. <sup>c</sup>SD = standard deviation. <sup>d</sup>SEP = standard error of prediction. <sup>e</sup>R<sup>2</sup> = coefficient of determination for external validation. <sup>f</sup>RPD = SD/SEP. <sup>g</sup>SEL = standard error of laboratory (reference analyses).

where  $\sigma_g^2$  is the genetic variance,  $\sigma_e^2$  the mean effective error,  $r$  is the number of locations,  $\sigma_{ge}^2$  is the variance in genotype  $\times$  environment interactions, and  $e$  is the number of years. Pearson's pairwise correlation coefficients between different seed quality traits were calculated using the correlation function in SPSS for mean trait values of each genotype from independent environments.

## RESULTS

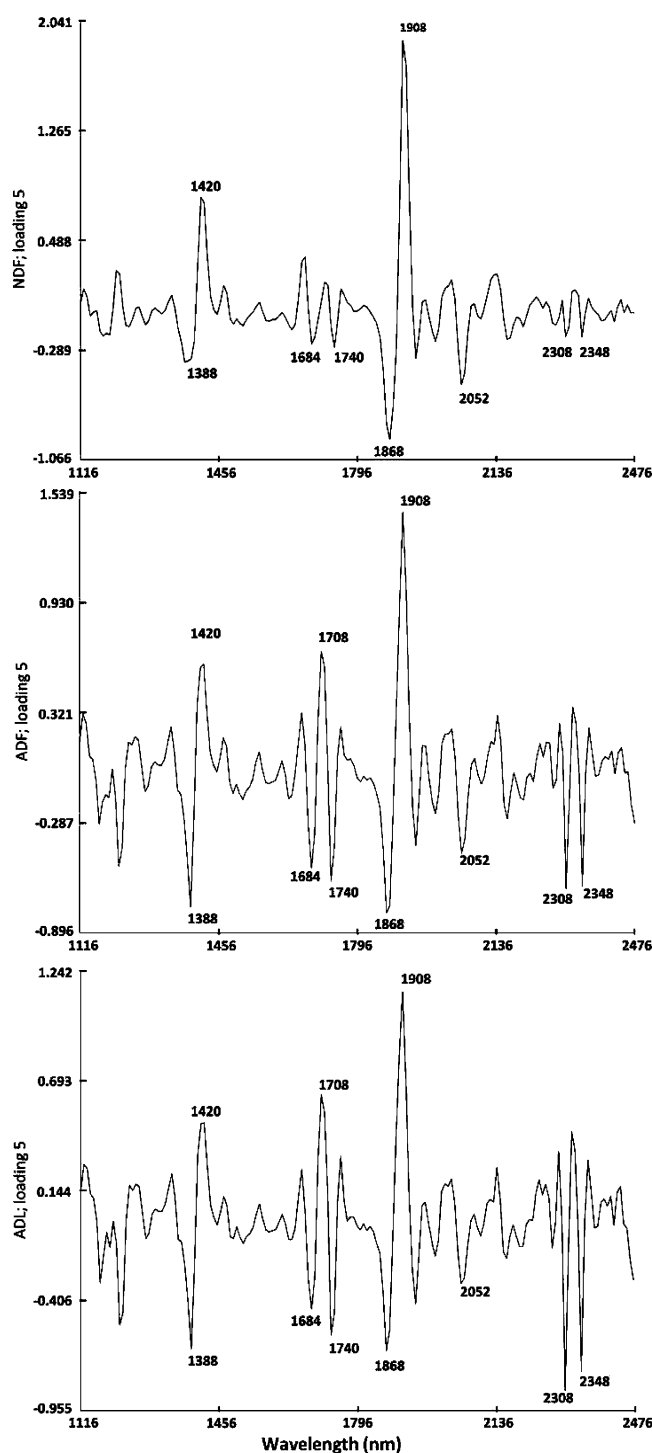
**NIRS Calibrations and Cross Validations for Fiber Fractions.** A broad range of fiber fractions were captured by both the calibration sets (cf. Table 1) and the validation sets (cf. Table 2). On the basis of the reference values six new NIRS calibrations estimation of NDF, ADF, and ADL in 1 mL microcvettes and 10 mL macrocvettes were developed. The results of cross-validation of the calibrations with statistical parameters are shown in Table 1. The lowest SECV values and the highest R<sup>2</sup><sub>cv</sub> values were obtained for the calibration equations for ADL, followed by the equations for ADF and NDF. Correspondingly, the SECV/SEL ratios, which show the relationship between the errors of the cross-validation and that of the reference wet chemistry, ranged from 1.29 for ADL to 2.36 for NDF in macrocvettes and from 1.33 for ADL to 2.35 for NDF in microcvettes. The SD/SECV ratios, which show the relationship between the naturally existing variation in the calibration population and the error of the calibration, ranged from 1.64 for NDF to 2.49 for ADL in the macrocvettes and from 1.54 for NDF to 2.65 for ADL in microcvettes.

The variable numbers of samples used for the development of the respective calibrations led to different numbers of T-outlier eliminations for the three fiber fractions. Totals of 11 NDF samples, 9 ADF samples, and 14 ADL samples showed large discrepancies ( $T$  values  $> 2.5$ ) between their reference values and NIRS predictions. Only 4 NDF samples, 6 ADF samples, and 7 ADL samples were identified as T-outliers in the microcvette estimates.

**Modified Partial Least Square Loadings.** MPLS loading plots (Figure 1) for the second-derivative (2,5,5,2) transformation illustrate the regression coefficients of each wavelength and indicate which wavelengths predominantly influence the equation model. The three fiber fractions share the same peaks at 1388, 1420, 1868, 1908, and 2052 nm, whereas peaks at 1684, 1708, 1740, 2308, and 2348 nm contribute more to the loadings for ADF and ADL than to NDF. Identification of chemical compounds and groups specific for different wavelengths with the WINISI II v. 1.50 software revealed an association of the MPLS loadings for NDF, ADF, and ADL with several functional groups. Combined vibrations of C–H groups associated with aromatic compounds at 1420 nm and O–H stretch groups at 1908 nm contributed significantly to all three fiber fractions, as did N–H protein groups at 2052 nm. The MPLS spectra for ADF and ADL were particularly strongly influenced by the absorbance of C–H stretching of aromatic compounds at 1684 nm, the S–H stretching groups at 1740 nm, and the C–H and C–O stretching groups related to oil at 2308 and 2348 nm, respectively. The MPLS loadings for microcvettes (not shown) showed absorbance patterns similar to those of the macrocvettes, the only visible difference being a slightly lower influence of the spectral region at 1908 nm for all three fiber fractions.

**External Validation of NIRS Calibrations.** External validation of the NIRS calibrations was carried out using 49 seed samples for macrocvettes and 40 samples for microcvettes, respectively. The variation captured within the validation samples reflects the same broad distribution for NDF, ADF, and ADL found in the calibration population. Table 2 shows the range, mean, and standard deviation (SD) values for the reference chemistry measurements of the validation set, along with the statistical description of the validation. For both seed volumes the best validation was





**Figure 1.** MPLS loading plots showing the highest correlation for neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and acid detergent lignin (ADL) in 10 mL macrocuvettes for second-derivative transformation (2,5,5,2).

achieved for the ADL calibrations, with  $R^2$  values of 0.81/0.78 and SEP values of 0.96/0.92 for macrocuvette/microcuvette estimations, respectively. Corresponding to the findings for the calibration and cross-validation statistics, the external validation of ADF contents were better than those for NDF. Figure 2 presents the graphical regressions of NIRS-predicted and wet chemistry reference values, together with the calculated SEP of the external validation for all three fiber fractions and both seed

volumes. The distribution of the scattering around the external validation improves from NDF to ADL. These results presumably reflect the different individual chemical compounds that contribute to reflection and absorption in the NIRS analysis. Whereas the calibration equation for ADL takes only the reflection of phenylpropanoid lignin precursors into account, the calibration for NDF additionally incorporates the spectral information of hemicellulose and cellulose components.

The calculated RPD values, which illustrate how the error in prediction compares to the naturally existing trait variation, ranged from 2.26 for ADL to 1.62 for NDF in 10 mL seed volumes and from 2.12 (ADL) to 1.44 (NDF) for 1 mL seed volumes. The ratios observed for SEP/SEL show the relationship between the errors of NIRS prediction and the reference chemistry and reflect again that the developed calibrations are most accurate for ADL followed by ADF and NDF (Table 2).

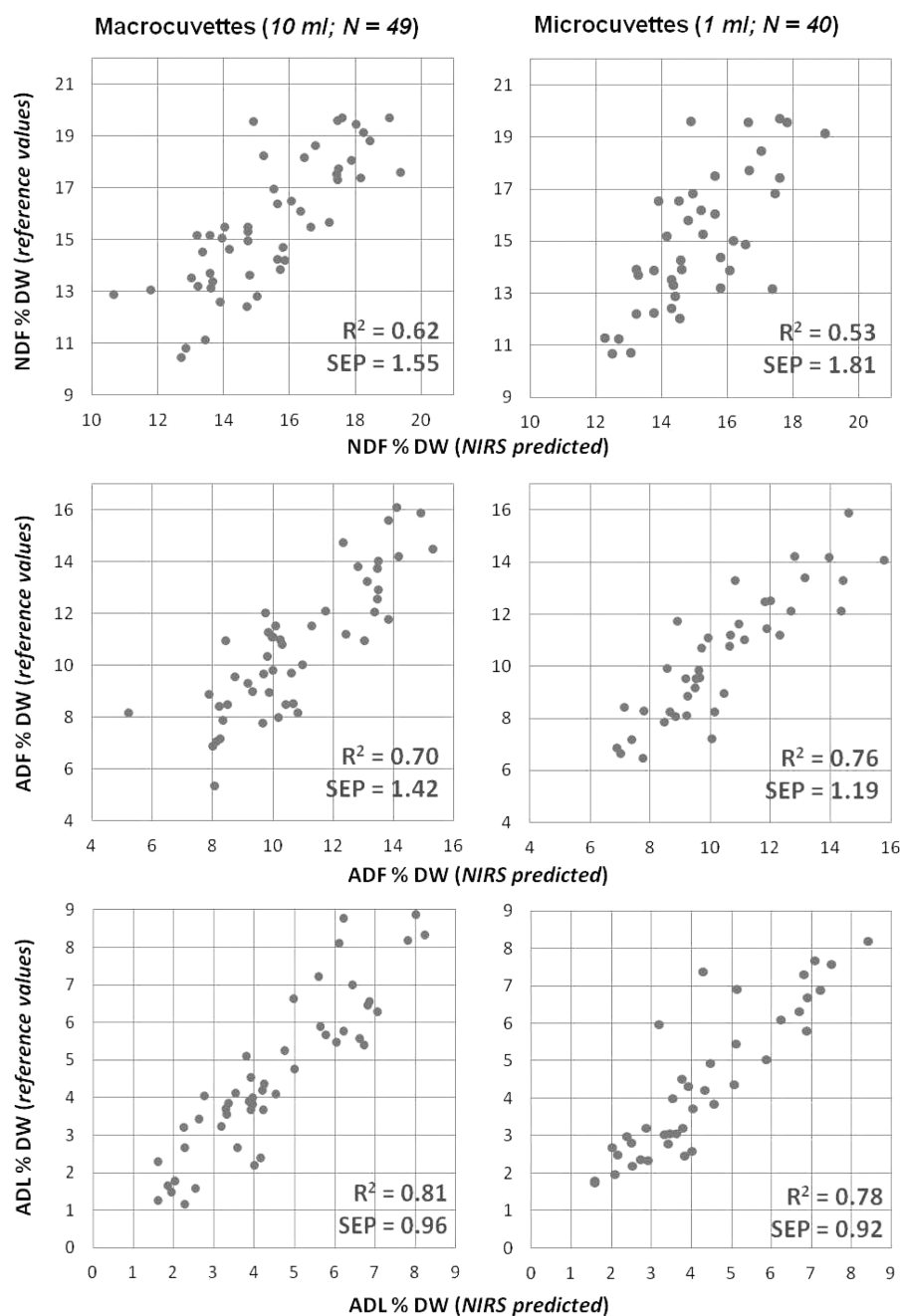
**Evaluation of NIRS Calibration and Phenotypic Trait Analysis in Breeding Populations.** The application of newly developed NIRS calibrations for fiber fraction in two different winter oilseed rape DH populations uncovered a broad variation for relevant fiber fractions. Table 3 shows all of the observed trait data for the YE2-DH and ExV8-DH populations together with trait values for the different crossing parents. The results clearly demonstrate that the developed NIRS calibrations have the potential to detect strong variation in seed fiber in materials of very different genetic origins (Figure 3).

Interestingly, in the dark-seeded population ExV8-DH several DH lines were identified showing a negative transgressive segregation resulting in lower fiber contents than the crossing parents. The offspring from this cross showed a particularly unexpected segregation for seed ADL content, ranging from 3.2 to 8.4% of seed dry weight, although the population displays only a very limited segregation for seed color in the range from dark brown to black. Hence, the use of seed color as a selection marker for low ADL is not possible, meaning that seed color-independent NIRS calibrations are an extremely useful new selection tool.

Figure 3 compares the ADL variation uncovered in both DH populations with regard to seed color. In YE2-DH, which exhibits a broad variation for seed color, a close correlation ( $r = 0.834$ ) was observed between seed color and ADL content (Table 4). Although ExV8-DH lines reveal only a weak variation for seed color, this population still showed a moderate correlation of ( $r = 0.621$ ) between seed color and ADL content (Table 4).

The observed trait data for important seed quality components were used to calculate broad sense heritabilities ( $h^2$ ; Table 3). The  $h^2$  values for ADL of 0.84 in Ye2-DH and 0.91 in ExV8-DH indicate that individual fiber fractions are highly heritable regardless of environmental conditions. This is another very strong advantage of selection for reduced ADL content using NIRS rather than using the environmentally instable seed color as a selection marker.

Further phenotypic correlations were calculated among important seed quality traits on the basis of mean trait values of each genotype from independent environments. Pearson's correlation coefficients ( $r$ ) among different seed quality traits are presented together in Table 4 for the YE2-DH and ExV8-DH populations. A strong negative correlation was detected between oil content and NDF. In contrast, ADL showed significant but weak positive correlations with oil content for



**Figure 2.** Graphical regression of NIRS-predicted and reference values for NDF, ADF, and ADL in two seed volumes (10 and 1 mL).  $R^2$  = coefficient of determination for independent validation; SEP = standard error of prediction.

both YE2-DH and ExV8-DH, whereas NDF was positively correlated to ADL. These observations reflect the competition between carbon signaling pathways involved in oil biosynthesis, on the one hand, and the synthesis of hemicellulose and cellulose (which are included in the NDF fraction) on the other. In contrast to the widely held view that light-seeded oilseed rape is associated with increased oil content, both YE2-DH and ExV8-DH showed the opposite effect, with seed color and oil content being significantly positively correlated. This indicates that darker-seeded lines in these two populations in fact contained more oil than lighter-seeded lines. Conversely, weak but significant negative correlations were found between seed color and protein content and between ADL and protein content (Table 4). Only a very weak correlation was found

between ADL and seed glucosinolate content, demonstrating that antinutritive fiber can be reduced without a negative pleiotropic effect on this other major oilseed rape seed meal quality component.

## DISCUSSION

**NIRS Calibrations and External Validation.** Seed fiber compounds are of high interest in the breeding of new oilseed rape and canola varieties with improved seed meal digestibility. For reliable selection of improved breeding lines an accurate and high-throughput analytical technique for seed fiber fractions is required. Font et al.<sup>9,20</sup> demonstrated the utility of NIRS calibrations for ADF screening in intact *B. napus* seeds. In our study we developed new NIRS calibrations for NDF,

Table 3. Results of the NIRS Analysis of Important Seed Quality Traits for the Parents (Express 617V, V8V, and 1012-98V) and the Two *B. napus* DH Populations ExV8-DHV and YE2-DHV

	Express 617			V8			1012-98			YE2-DH (N = 166)			ExV8-DH (N = 250)		
	mean/ range	SD <sup>a</sup>		mean/ range	SD <sup>a</sup>		mean/ range	SD <sup>a</sup>		mean/ range	SD <sup>a</sup>		mean/ range	SD <sup>a</sup>	<i>R</i> <sup>2b</sup>
seed color <sup>c</sup>	8.43 8.15–8.95	0.45		8.15 7.90–8.50	0.31		4.08 3.55–4.75	0.61		6.24 2.70–8.98	1.24		8.48 6.95–9.28	0.32	0.71
NDF (% DW)	15.92 15.60–16.45	0.46		15.13 14.50–15.90	0.71		14.83 14.60–15.05	0.23		15.87 12.20–19.75	1.38		15.99 11.90–19.30	0.79	0.92
ADF (% DW)	11.35 10.85–11.15	0.67		11.12 10.55–11.75	0.60		8.97 8.70–9.30	0.31		10.65 6.70–14.41	1.24		11.57 7.35–15.00	1.11	0.69
ADL (% DW)	6.17 5.80–6.55	0.38		5.55 5.35–5.80	0.23		2.83 2.55–3.00	0.25		4.03 1.20–7.60	1.06		5.83 3.20–8.40	0.75	0.91
oil (% DW)	48.82 48.25–49.50	0.63		51.12 48.75–52.40	2.05		43.48 42.70–44.10	0.71		44.56 34.20–55.80	3.99		49.48 39.70–58.70	2.79	0.79
protein (% DW)	20.82 20.65–20.95	0.15		22.10 21.55–23.05	0.83		22.53 21.85–23.70	1.02		22.70 13.60–29.70	3.22		21.18 14.45–22.05	1.61	0.41
glucosinolates (μmol/g)	20.63 19.40–22.25	1.46		48.75 40.10–53.10	7.49		23.27 17–35–31.55	7.39		21.23 5.21–67.25	9.57		33.26 7.50–71.15	12.45	0.93

<sup>a</sup>SD = standard deviation. <sup>b</sup>*R*<sup>2</sup> = broad sense heritability. <sup>c</sup>Seed color values: 1 = light, 9 = dark.

ADF, and also ADL, the most nutritionally relevant fiber compound for use of oilseed rape and canola meals in monogastric animal feeding. During the selection of genotypes with a broad variation for the calibration, the seed color of *B. napus* was taken into account, because it is reported that the yellow seed character is associated with decreasing fiber contents.<sup>11</sup> Font et al.<sup>20</sup> used the total spectral range from the visible and near-infrared region (450–2500 nm) for the development of NIRS calibrations for ADF, reasoning that lower amounts of fiber are always associated with lighter seed color and that the observed absorption in the visible region should thus improve the calibration accuracy. In contrast, we chose not to include the spectral information from the visible region in our calibrations, because the identification of H-outliers during principal component analysis showed a clear clustering of light-seeded and dark-seeded genotypes when the visible region was taken into account. For representative NIRS calibrations such an inhomogeneity of the calibration population is undesirable; hence, it was necessary to remove the visible spectral data from the calibration.

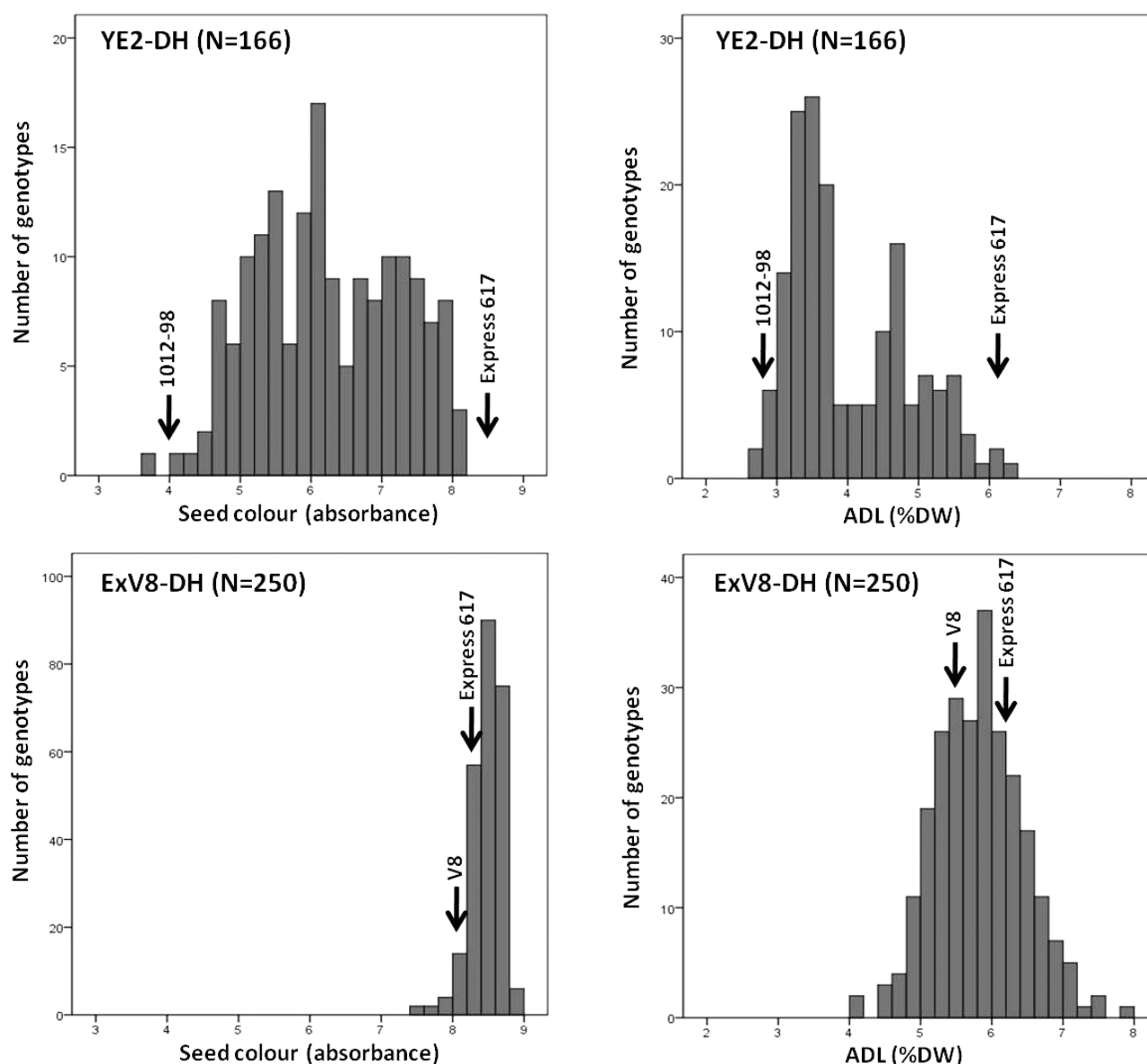
The RPD (SD/SEP) values for the new ADL calibrations were slightly below the cutoff value of RPD = 3 recommended by Williams and Sobering<sup>18</sup> for the use of NIRS equations as a suitable screening technique. On the other hand, some papers described NIRS calibrations as adequate when the SEP was within 2 times the SEL.<sup>10,21,22</sup> The ratios observed in this study fall within this range for both seed volumes. Furthermore, the observed RPD values, at least for ADL, are sufficient for recommendation of the calibrations as a useful selection tool in modern rapeseed breeding programs. A comparable RPD value of 2.5 for ADL was reported by Kong et al.,<sup>10</sup> who used second-derivate mathematical treatments (2,4,4,1 or 2,5,5,1) to evaluate NIRS calibrations for fiber fractions in rice. The ADF calibrations were less accurate than those for ADL; however, the *R*<sup>2</sup> statistics were still comparable with previously reported results for NIRS calibrations for ADF in different *Brassica* species and ADL in *Oryza sativa*.<sup>9,10,20</sup>

Although the precision of the NDF calibrations was lower compared to those for ADF and ADL, these are still sufficient to differentiate between high and low NDF oilseed rape breeding material. Analogous results were presented by Kong et al.<sup>10</sup> for NIRS calibrations in rice, where the calibrations for NDF are less accurate than those for ADF and ADL.

In both seed volumes (10 and 1 mL) comparable validation statistics were generated with slight differences in the observed *R*<sup>2</sup> values. A reasonable explanation is the variable amount of seeds, which may influence the strength of essential reflections and absorptions during the NIRS measurement. Nevertheless, the results obtained in this study are precise enough to recommend the use of calibrations for both the macrocuvettes and microcuvettes as selection tools for seed meal quality. The ability to use microcuvettes for NIRS-based selection is a major advantage in early breeding generations when only small quantities of seed are available and sufficient material is to be saved for planting the next breeding generation.

Because NIRS methods are based on the reflection and absorption of different chemical molecules in analytical samples, a verification of the trueness of prediction is recommended, particularly for minor seed components such as ADL. In this context rapeseed genotypes segregating for high and low ADL contents were selected for further analytical measurements. ADL represents polymeric phenolic secondary cell wall components. As such, it has its origin in the





**Figure 3.** Phenotypic distributions for seed color and acid detergent lignin (ADL) in YE2-DH ( $N = 166$ ) and ExV8-DH ( $N = 250$ ) calculated with mean trait values (NIRS estimates) over all environments. Indicated with arrows are the mean values of the parents '1012-98', 'V8', and 'Express 617'.

**Table 4.** Pearson's Correlation Coefficient ( $r$ ) among Seed Quality Traits in 166 DH Lines of the Winter Oilseed Rape Population YE2-DH (above Diagonal) and in 250 DH Lines of the Population ExV8-DH (below Diagonal)<sup>a</sup>

	seed color	NDF	ADF	ADL	seed oil	seed protein	glucosinolates
seed color		0.342**	0.575**	0.834**	0.404**	-0.286**	-0.109**
NDF	0.283**		0.836**	0.492**	-0.573**	0.347**	0.111**
ADF	0.578**	0.348**		0.776**	-0.141**	0.023	-0.173**
ADL	0.621**	0.457**	0.830**		0.270**	-0.121**	-0.119**
seed oil	0.227**	-0.537**	0.313**	0.289**		-0.788**	-0.295**
seed protein	-0.129**	0.199**	-0.145**	-0.068**	-0.653**		0.284**
glucosinolates	-0.091**	0.202**	-0.258**	0.070**	-0.105**	0.175**	

<sup>a</sup>\*, \*\*: significant at the 0.05 and 0.01 levels, respectively.

phenylpropanoid pathway where phenolic acids and phenolic mono- and polymers are produced<sup>23</sup> as precursors to lignin polymer formation. In collaboration with colleagues from the Leibniz Institute for Plant Biochemistry (IPB, Halle, Germany), we performed analyses of several phenolic compounds (monomers, polymers, acids) using liquid chromatography–

mass spectrometry (LC-MS) and were able to observe strong correlations between ADL contents estimated by NIRS and LC-MS measurements for specific lignin precursors (A. Frolov and B. Wittkop, unpublished data). In particular, a strong correlation ( $r = 0.914$ ) was identified with sinapic acid, known as the major phenolic acid in rapeseed and a major precursor

for monolignol subunits. Other notable correlations were obtained with 5-hydroxyferulic acid ( $r = 0.825$ ) and *p*-coumaric acid, which are also known as important monolignol precursors.<sup>23</sup> These observations appear to verify that our NIRS calibrations for ADL are indeed very useful for prediction of phenolic fiber contents in oilseed rape seed samples. The presence of lignin, polyphenols (tannins), and phenolic acids as well as their degradation products in different *Brassica* species seed hulls was reported by Durkee<sup>24</sup> and Theander et al.<sup>25</sup> In addition, Theander et al.<sup>25</sup> observed differences of phenolic compounds in light- and dark-seeded turnip rape (*B. rapa*), particularly for contents of total lignin and condensed polyphenols.

**MPLS Loading Plots.** MPLS loading plots allow an observation of wavelengths with high variation in the calibration set that may be associated with spectral regions of known chemical origin.<sup>24</sup> Examination of loadings for NDF, ADF, and ADL calibration equations suggested that absorbance effects related to C–H, O–H, and N–H groups in aromatic and protein regions are important. Moreover, in all loadings a major influence at 1908 nm was observed, which is reported as a water-specific spectral region.<sup>20</sup> An influence of water-specific O–H groups has been reported previously in NIRS calibrations for fiber in cereal products<sup>26</sup> and is expected in our study because nondried seeds were used. Interestingly, only the ADF and ADL loading plots reveal a significant contribution to the model of the C–H and C–O groups of lipids (2308 and 2348, respectively). Wavelengths for specific absorbance of oil functional groups are known as major contributors to NIRS calibrations for ADF in *Brassica* species<sup>20</sup> and for dietary fiber in high-fat cereal products.<sup>26</sup> In contrast, the contribution of 2308 and 2348 nm to the NDF loading plot was relatively small.

**Phenotypic Trait Analysis and NIRS as a Selection Tool.** The phenotypic results we obtained with our new calibrations for fiber fractions showed that a huge natural variation exists in oilseed rape breeding material for different fiber fractions, especially ADL. The ADL fraction was found to have a positive correlation with seed color not only in the yellow-seeded population YE2-DH but also in the dark-seeded population ExV8-DH. This is presumably because the flavonoid precursors of seed coat pigments have a common origin to the phenolic lignin precursors represented as ADL in this study.<sup>27</sup> The large variation in seed ADL observed in the dark-seeded ExV8-DH population demonstrates clearly that seed fiber, particularly ADL, needs to be analyzed independently from seed color to uncover the complete existing variation of this trait in diverse *B. napus* breeding material.

Correlations of ADL to seed coat phenolic compounds suggest that low ADL content is associated with reduced seed coat thickness. The reduction of fiber in the seed meal correlated to a simultaneous increase in protein content, presumably due to common amino acid precursors in the phenylpropanoid and storage protein biosynthesis pathways. This correlation means that selection of low-ADL germplasm will have a double-positive effect on the overall seed meal quality.<sup>28</sup> In some low-fiber winter oilseed rape genotypes we were able to decrease fiber and increase protein contents without reducing the oil content.<sup>6</sup> A combined NIRS-based selection for low ADL, high protein, and high oil content without a compromise for increased glucosinolate content represents a great advance in our ability to breed oilseed rape for simultaneous improvement of both oil content and meal

quality. Because NIRS selection is already a standard tool in oilseed rape and canola breeding programs, the new fiber calibrations can be integrated into existing NIRS selection programs after further improvements of the calibrations with a larger panel of genotypes in the calibration and validation sets.

The high heritability we estimated for seed ADL content indicates that reliable selection for this trait can already be carried out in early breeding generations. Because seed samples from single plants must be selected in early generations, it is important to use nondestructive selection methods that are suitable for small quantities of seed. Our NIRS calibrations for microcuvettes require only around 50 seeds per sample, enabling a nondestructive screening for low-ADL lines at a very early stage in the breeding process. NIRS selection for seed fiber fractions in young breeding generations can potentially reform and accelerate the breeding of varieties that have higher oil yields combined with a higher meal quality.

In this study we describe new NIRS calibrations for major seed fiber fractions in intact *B. napus* seeds in two different seed volumes. We demonstrate that the calibrations for ADF, NDF, and particularly the most relevant antinutritive fiber component, ADL, can be effectively used to select these fractions by NIRS in both young and advanced practical breeding material as well as in experimental seed lots and commodities. Phenotypic analysis of different winter oilseed rape populations revealed that genetic variation for reduced ADL content is widespread not only in yellow-seeded genotypes but also in dark-seeded materials. We therefore recommend the use of high-throughput, nondestructive NIRS selection for all important seed quality traits (oil, protein, glucosinolate, and fiber) to obtain an overall improved *B. napus* seed quality. Furthermore, these NIRS calibrations can also be efficiently used to determine major quality traits of rape seed commodities.

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Phone: +49-641-9937421. Fax: +49-641-9937429. E-mail: wolfgang.friedt@agrar.uni-giessen.de.

### Funding

This work was carried out as part of the collaborative project “GABI-Canada: YelLowSin Rapeseed” with funding from the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) and support from Deutsche Saatveredelung AG, KWS Saat AG, Norddeutsche Pflanzenzucht H.-G. Lembke KG, and SAATEN-UNION BIOTEC GmbH (Germany).

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Petra Degen, Birgit Keiner, Swetlana Renner, and Nelly Weis for excellent technical assistance.

## ABBREVIATIONS USED

ADF, acid detergent fiber; ADL, acid detergent lignin; NDF, neutral detergent fiber; NIRS, near-infrared reflectance spectroscopy; PCA, principal component analysis; MPLS, modified partial least-squares;  $R^2$ , coefficient of determination;  $R^2_{cv}$ , coefficient of determination for cross-validation; SD, standard deviation; SEC, standard error of calibration; SECV, standard error of cross-validation; SEP, standard error of prediction; SEL, standard error of laboratory; RPD, ratio between SD and

SEP;  $h^2$ , broad sense heritability;  $r$ , Pearson's correlation coefficient; DH, doubled haploid.

## REFERENCES

- (1) Kracht, W.; Dänicke, S.; Kluge, H.; Keller, K.; Matzke, W.; Henning, U.; Schumann, W. Effect of dehulling of rapeseed on feed value and nutrient digestibility of rape products in pigs. *Arch. Anim. Nutr.* **2004**, *58*, 389–404.
- (2) Matthäus, B. Effect of dehulling on the composition of antinutritive compounds in various cultivars of rapeseed. *Fett/Lipid* **1998**, *100*, 295–301.
- (3) Slominski, B. A.; Campbell, L. D.; Guenter, W. Carbohydrates and dietary fibre components of yellow and brown-seeded canola. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 704–707.
- (4) Slominski, B. A.; Simbaya, J.; Campbell, L. D.; Rakow, G.; Guenter, W. Nutritive value for broilers of meals derived from newly developed varieties of yellow-seeded canola. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1999**, *78*, 249–262.
- (5) Marles, S.; Gruber, M. Y. Histochemical characterisation of unextractable seed coat pigments and quantification of extractable lignin in the Brassicaceae. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 251–262.
- (6) Wittkop, B.; Snowdon, R. J.; Friedt, W. Status and perspective of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe. *Euphytica* **2009**, *170*, 131–140.
- (7) Font, R.; Del-Rio Celestino, M.; De Haro-Bailon, A. The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Ind. Crops Prod.* **2006**, *24*, 307–313.
- (8) Tillmann, P. Recent experiences with NIRS analysis in rapeseed. *GCIRC Bull.* **1997**, *13*, 84–87.
- (9) Font, R.; Wittkop, B.; Badani, A. G.; del Rio-Celestino, M.; Friedt, W.; Lühs, W.; de Haro-Baillon, A. The measurements of acid detergent fibre in rapeseed by visible and near-infrared spectroscopy. *Plant Breed.* **2005**, *124*, 410–412.
- (10) Kong, X.; Xie, J.; Wu, X.; Huang, Y.; Boa, J. Rapid prediction of acid detergent fiber, neutral detergent fiber, and acid detergent lignin of rice materials by near-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2843–2848.
- (11) Badani, A. G.; Snowdon, R. J.; Wittkop, B.; Lispa, F. D.; Baetzel, R.; Horn, R.; De Haro, A.; Font, R.; Lühs, W.; Friedt, W. Colocalization of a partially dominant gene for yellow seed colour with a major QTL influencing acid detergent fibre (ADF) content in different crosses of oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome* **2006**, *49*, 1499–1509.
- (12) Van Soest, P. J.; Wine, R. H. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1967**, *50*, 50–55.
- (13) Goering, H. K.; Van Soest, P. J. Forage fibre analysis: apparatus, reagents, procedures, and some applications. *USDA-ARS Agric. Handb.* **1970**, No. 379.
- (14) Tillmann, P. The analysis of rapeseed (*Brassica napus* L.) in a network of NIRS instruments. *GCIRC Bull.* **1997**, *14*, 142–147.
- (15) Baetzel, R. Stabilität und Genetik von wertbestimmenden Inhaltsstoffen gelbsamiger Rapslinien (*Brassica napus*) als Basis für die Züchtung von qualitativ hochwertigen Körnerölraps-Sorten. Cuvillier, Göttingen, Germany, 2005; Dissertation.
- (16) Barnes, R. J.; Dhanoa, M. S.; Lister, S. J. Standard normal variate transformation and de-trending of near infrared diffuse reflectance spectra. *Appl. Spectrosc.* **1989**, *43*, 772–777.
- (17) Shenk, J. S.; Westerhaus, M. O. Calibration the ISI way. In *Near-Infrared Technology: The Future Waves*; Davies, A. M. C., Williams, P. C., Eds.; NIR Publications: Chichester, U.K., 1996; pp 198–202.
- (18) Williams, P. C.; Sobering, D. C. How do we do it: a brief summary of the methods we use in developing near infrared calibrations. In *Near-Infrared Technology: The Future Waves*; Davies, A. M. C., Williams, P. C., Eds.; NIR Publications: Chichester, U.K., 1996; pp 185–188.
- (19) Basunanda, P.; Spiller, T. H.; Hasan, M.; Gehring, A.; Schondelmaier, J.; Lühs, W.; Friedt, W.; Snowdon, R. J. Marker-assisted increase of genetic diversity in double-low seed quality winter oilseed rape genetic background. *Plant Breed.* **2007**, *126*, 581–587.
- (20) Font, R.; Del Rio, M.; Fernandez, J. M.; De Haro, A. Acid detergent fibre analysis in oilseed Brassicas by near-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2917–2922.
- (21) Zum Felde, T.; Baumert, A.; Strack, D.; Becker, H. C.; Möllers, C. Genetic variation for sinapate ester content in winter rapeseed (*Brassica napus* L.) and development of NIRS calibration equations. *Plant Breed.* **2007**, *126*, 291–296.
- (22) Velasco, L.; Matthäus, B.; Möllers, C. Nondestructive assessment of sinapic acid esters in *Brassica* species: I. Analysis by near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Sci.* **1998**, *38*, 1645–1650.
- (23) Bonawitz, N. D.; Chapple, C. The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype and phenotype. *Annu. Rev. Genet.* **2010**, *44*, 337–363.
- (24) Durkee, A. B. The nature of tannin in rapeseed (*Brassica campestris*). *Phytochemistry* **1971**, *10*, 1583–1585.
- (25) Theander, O.; Aman, P.; Miksche, G. E.; Yasuda, S. Carbohydrates, polyphenols, and lignin in seed hulls of different colors from turnip rape. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*, 270–273.
- (26) Kays, S. E.; Windham, W. R.; Franklin, E. B. Prediction of total dietary fiber by near-infrared reflectance spectroscopy in high-fat- and high-sugar-containing cereal products. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 854–861.
- (27) Nesi, N.; Delourme, R.; Bregeon, M.; Falentin, C.; Renard, M. Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of *Brassica napus* L. seed. *C.R. Biol.* **2008**, *331*, 763–771.
- (28) Rahman, M.; McVetty, P. B. E. A review of *Brassica* seed colour. *Can. J. Plant Sci.* **2011**, *91*, 437–446.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Entwicklung von NIRS-Kalibrationen für verschiedene Faserfraktionen in intakten Rapssamen

Der Rohfasergehalt der Rapssamen wird häufig als einer der wichtigsten limitierenden Faktoren für einen vollwertigen Einsatz des Rapsmehles als hochwertiges Eiweißfuttermittel in der Tierernährung angesehen, da durch zu hohe Gehalte die Verdaulichkeit bekanntlich negativ beeinflusst wird (Schöne 1993, Kracht *et al.* 2004, Slominski *et al.* 1999). Die Züchtung von Rapssorten mit verringerten Rohfasergehalten und einer dadurch verbesserten Verdaulichkeit ist mithin von besonderem Interesse, um die Verwendungsmöglichkeiten der wichtigsten einheimischen Ölpflanze weiter zu steigern. Die herkömmliche Analytik der verschiedenen Faserfraktionen bedient sich vorwiegend zeitaufwändiger nasschemischer Methoden und ist mit einer Zerstörung des Zuchtmaterials verbunden. Dies ist insbesondere in der Selektion von Rapsgenotypen schwierig, denn in der Regel stehen nicht genügend Samen zur Verfügung, um zum einen die Inhaltsstoffanalytik und zum anderen die Materialerhaltung zu realisieren. Die Entwicklung neuer Hochdurchsatz-Analysemethoden, basierend auf der Nahinfrarot-Reflektionsspektroskopie (NIRS) ist deswegen unabdingbar für die Selektion von Rapsgenotypen mit verringerten Fasergehalten. Der Einsatz von NIRS-Kalibrationen in der Qualitätszüchtung von Raps ist ein vielversprechendes Tool für die Selektion auf verschiedene Sameninhaltsstoffe; Ziel ist die Etablierung einer zerstörungsfreien Hochdurchsatz-Analytik für die moderne Rapszüchtung (Font *et al.* 2006). Bislang sind für Raps noch keine Berichte bekannt, die eine NIRS-Analytik aller relevanten Faserfraktionen, wie NDF (*neutral detergent fibre*), ADF (*acid detergent fibre*) und ADL (*acid detergent lignin*) am intakten Samen beschreiben. Lediglich die Entwicklung einer NIRS-Kalibration für ADF an intakter und gemahlener Rapssaat ist von Font *et al.* (2003, 2005) für verschiedene *Brassica*-Arten beschrieben. Die Nutzung solcher einseitigen Kalibrationen für die Selektion von Rapsgenotypen mit einer verbesserten Schrotqualität ist denkbar aber noch nicht ausreichend, denn alleine durch den ADF-Gehalt ist eine Aussage über die tatsächliche Qualität des Schrotes nicht vollständig möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde deswegen die Entwicklung von NIRS-Kalibrationen für die relevanten Faserfraktionen NDF, ADF und ADL an intakten Rapssamen vorrangig verfolgt. Für eine erfolgreiche Entwicklung von NIRS-Kalibrationen ist eine möglichst breite Variation für die zu untersuchenden Merkmale in der Kalibrations-

Population notwendig. Daher wurden für die Entwicklung der Faserkalibrationen verschiedene Rapsgenotypen mit unterschiedlicher Samenfarbe einbezogen, denn für hellsamiges Rapsmaterial wird in der Literatur mehrfach von reduzierten Fasergehalten im Vergleich zu schwarzsamigen Genotypen berichtet (Badani *et al.* 2006, vgl. Rahman & McVetty 2011, vgl. Friedt *et al.* 2002). Zudem wurden NIRS-Kalibrationen für verschiedene Samenvolumen in Makro- (10ml) und Mikroküvetten (1ml) entwickelt, um einerseits die Fasergehalte in größeren Samenproben zu ermitteln und diese dann auch mit bereits bestehenden Kalibrationen für weitere wichtige Sameninhaltsstoffe, wie beispielsweise Öl- und Proteingehalt, zu kombinieren. Andererseits war die Entwicklung von NIRS-Kalibrationen in Mikroküvetten, mit denen eine Messung an lediglich ca. 50 Samen möglich ist, eine notwendige Voraussetzung für die umfassende Erfassung der vorhandenen genetischen Variation. Gerade in jüngeren Zuchtgenerationen und bei exotischen oder resynthetisierten Rapsgenotypen ist oft nicht genügend Samenmaterial für eine Messung in der Makroküvette vorhanden.

Die Güte von NIRS-Kalibrationen wird anhand verschiedener statistischer Maßzahlen beschrieben, wobei der Standardfehler der Kreuzvalidierung (SEC) und das Bestimmtheitsmaß der Kreuzvalidierung ( $R^2_{cv}$ ) die aussagekräftigsten Werte für die reine Kalibrationserstellung liefern. Der Standardschätzfehler (SEP) und das Bestimmtheitsmaß der Validierung ( $R^2$ ) beschreiben die Genauigkeit der Kalibration für die Messung in unabhängigen Samenproben während des Validierungsprozesses. Bei den entwickelten NIRS-Kalibrationen für NDF, ADF und ADL wird deutlich, dass sowohl für die Kalibration als auch die Validierung die besten statistischen Ergebnisse für den ADL-Gehalt, gefolgt von den ADF- und NDF-Gehalten errechnet wurden. Außerdem wurde die höhere Genauigkeit der Kalibrationen für den ADL-Gehalt in den beiden unterschiedlichen Samenvolumen (10ml und 1ml) bestätigt, und es konnten keine deutlichen Unterschiede in den errechneten „Genauigkeiten“ der einzelnen Kalibrationen für Makro- und Mikroküvetten ermittelt werden. Die zuverlässigeren Ergebnisse für die ADL-Fraktion sind unter Berücksichtigung der durch die verschiedenen Fraktionen beschriebenen Inhaltsstoffe nicht unerwartet, denn ADL beinhaltet, analytisch gesehen nur den Lignin-Gehalt und unterscheidet sich somit von ADF, wo neben Lignin noch Cellulose berücksichtigt wird und NDF, wo zusätzlich zu Lignin und Cellulose noch der Anteil der Zellwandgerüstsubstanz Hemicellulose in der Samenprobe miterfasst wird. Da NIRS-Kalibrationen auf der Regression zwischen den referenzchemisch ermittelten Gehalten der einzelnen Inhaltsstoffe und den spektralen Eigenschaften verschiedener funktioneller Gruppen der unterschiedlichen Inhaltsstoffe beruhen, wird eine

höhere Genauigkeit der Kalibrationen für solche Merkmale erwartet, bei denen nur einzelne Inhaltsstoffe, wie ADL, mit einbezogen werden.

Die erstellten NIRS-Kalibrationen für die Ermittlung der Samenfasergehalte in intakten Rapssamen sind in beiden Samenvolumina wenigstens für den ADL-Gehalt mit publizierten NIRS Kalibrationen für andere Kulturpflanzen vergleichbar (Kong *et al.* 2005, Kays *et al.* 1998). Basierend auf den errechneten  $R^2$ -Werten für die Kalibration und die Validierung können die entwickelten ADL-Kalibrationen sowohl für die Makro- als auch die Mikroküvette als hinreichend genau bezeichnet und ein Einsatz in der modernen Rapszüchtung empfohlen werden. Die erstellten Kalibrationen für die ADF- und NDF-Fraktion sind im Vergleich mit den ADL-Kalibrationen nicht so exakt aber dennoch ausreichend genau, um zumindest eine Selektion zwischen hohen und niedrigen ADF- bzw. NDF-Gehalten in Rapszuchtmaterial zu gewährleisten. Geringere Genauigkeiten von Kalibrationen für ADF- und NDF-Gehalte im Vergleich zu den Bestimmungen des ADL-Gehaltes mit NIRS sind auch in Reis von Kong *et al.* (2005) beschrieben.

Die neu entwickelten NIRS-Kalibrationen stellen ein wertvolles Selektions-Werkzeug in der wissenschaftlichen und praktischen Pflanzenzüchtung für die Entwicklung neuer Rapssorten mit verbesserter Schrotqualität dar. Insbesondere die Entwicklung einer NIRS-Kalibration für geringe Saatgutmengen in Mikroküvetten ist vorteilhaft für die Selektion auf reduzierte Fasergehalte in jungen Zuchtgenerationen, denn dadurch ist eine effektive Reduktion der zunächst zahlreichen Zuchtstämme möglich. In späteren Zuchtgenerationen kann dann der Fokus der Qualitätsverbesserung auf andere wertgebende Inhaltsstoffe, wie Öl und Protein gelegt werden. Die Kombination von Analysemethoden für verschiedene interessierende Sameninhaltsstoffe ermöglicht eine umfassende Qualitätsanalytik, und darüber hinaus wird durch die gleichzeitige Erfassung aller relevanten Sameninhaltsstoffe in einer einzigen Messung die Selektion auf eine optimierte Sameninhaltsstoff-Zusammensetzung ermöglicht. Dies ist insbesondere in der Winterrapszüchtung, wegen der kurzen Zeit von oft nur einem Monat für die Qualitätsanalytik zwischen Ernte und Wiederaussaat, von großer Bedeutung. Mit einer solchen Strategie kann die Züchtung von neuen Rapssorten mit verbesserter Schrotqualität aufgrund reduzierter Fasergehalte bei gleichzeitig erhöhten Öl- und Proteingehalten erleichtert und beschleunigt werden. Denn der Einsatz der neu entwickelten NIRS-Kalibrationen für NDF, ADF und ADL für die Selektion auf reduzierte Fasergehalte schafft wichtige Voraussetzungen für eine Verbesserung der dualen Verwertung der Rapssaat und eine damit verbundene Steigerung des Marktwertes von 00-Körnerraps.

## 4.2 Zusammenhänge zwischen Samenfarbe, Fasergehalt sowie Öl- und Proteingehalt und ihre Bedeutung für die Körnerölrapszüchtung

In der Literatur wird wiederholt von einer Reduktion der Fasergehalte bei einer gleichzeitigen Steigerung der wertgebenden Sameninhaltsstoffe Öl und Protein in verschiedenen hellsamigen *Brassica*-Arten bzw. Genotypen berichtet (Stringam *et al.* 1974, Shirzadegan & Röbbelen 1985, vgl. Rahman & McVetty 2011). Mit Hilfe der neu entwickelten NIRS-Kalibrationen für die Faserfraktionen NDF, ADF und ADL und der bereits existierenden NIRS-Kalibrationen für Samenfarbe, Öl- und Proteingehalt sowie für den Glucosinolatgehalt wurde eine umfassende Qualitätsanalytik verschiedener Winterrapspopulationen durchgeführt. Die beiden verwendeten Populationen gehen auf unterschiedliche Kreuzungen zurück und beinhalten aufgrund ihrer Erzeugung mithilfe der Haploidtechnik, doppelhaploide (DH), d.h. homozygote Linien. Die YE2-DH-Population geht auf eine Kreuzung zwischen der schwarzsamigen Inzuchtlinie ‚Express-617‘ und dem gelbsamigen Resynthese-Raps ‚1012-98‘ zurück, und die Population ExV8-DH hat neben ‚Express-617‘ die schwarzsamige Rapslinie ‚V8‘ als Elter. Für die Untersuchungen der Samenfarbe und von Samenschalenmerkmalen standen so ganz unterschiedliche Rapsgenotypen zur Verfügung, und das Untersuchungssaatgut stammte von verschiedenen mehrortigen Feldversuchen der Jahre 2003-2009.

Es konnte gezeigt werden, dass in beiden Populationen eine starke Korrelation zwischen der Samenfarbe und den Faserfraktionen NDF, ADF und ADL vorliegt, wobei der engste positive Zusammenhang, d.h. der höchste Korrelationskoeffizient ( $r$ ) zwischen den Merkmalen Samenfarbe und ADL-Gehalt festgestellt wurde. Die Korrelationen zwischen der Samenfarbe und dem ADF-Gehalt bzw. dem NDF-Gehalt waren in beiden Populationen etwas niedriger. Der a priori vermutete Zusammenhang zwischen der Samenfarbe und den Faserkomponenten kann so mit diesen Untersuchungen bestätigt werden. Aufgrund einer dünneren Samenschale zeigen hellsamige Rapsgenotypen zumeist die niedrigeren Fasergehalte. In solchen Samen sind weniger oder kleinere Zellen vorzufinden, die eine reduzierte Einlagerung der Zellwandgerüstsubstanzen ermöglichen (Stringam *et al.* 1974, Marles & Gruber 2004). Eine verringerte Einlagerung von Pigmenten, wie z.B. der kondensierten Tannine (Proanthocyanidine), ist oftmals auch als pleiotroper Effekt feststellbar (vgl. Lipsa *et al.* 2012). Darüber hinaus ist die biochemische Verknüpfung zwischen der phenolischen Faserkomponente Lignin und den kondensierten Tanninen über den Phenylpropanoid-Stoffwechsel bekannt und wegen gleicher oder ähnlicher Vorläufersubstanzen ableitbar.



Es ist jedoch bemerkenswert, dass dieser Zusammenhang nicht nur in der hellsamigen Population gefunden wurde, sondern auch in der schwarzsamigen Winterrapspopulation ExV8-DH. Erklärbar ist diese Tatsache mit der messbaren Variation der Samenfarbe in verschiedenen dunkelbraunen, rotbraunen und schwarzsamigen Saatgutproben. Eine solche Variation der Samenfarbe findet in der praktischen Pflanzenzüchtung normalerweise keine Beachtung und wird generell als schwarze Samenfarbe angesehen. Das verdeutlicht, dass durch die alleinige Selektion auf das Merkmal „Gelbsamigkeit“ zur Verbesserung der Rapsschrotqualität die vorhandene Variation für Fasergehalte in schwarzsamigen Winterrapsmaterial, wie im Falle der ExV8-DH, nicht mit beachtet wird und demzufolge solche Genotypen mit verringertem Fasergehalt im Zuchtmaterial verloren gehen können. Die von Marles & Gruber (2004) vorgeschlagene unabhängige Analytik der Samenschalenpigmentierung und der Fasergehalte, speziell des Ligningehaltes, zur Aufdeckung der vorhandenen genetischen Variation in *Brassica*-Arten wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützt. Sie unterstreichen wiederum die Notwendigkeit der Berücksichtigung möglichst aller Merkmale bei der Qualitätsanalytik sowie der züchterischen Selektion, wie es mit den neu entwickelten NIRS-Kalibrationen für NDF, ADF und ADL letztendlich möglich ist.

Die weitere Betrachtung der errechneten Korrelationen zwischen den verschiedenen Sameninhaltsstoffen zeigt, dass die häufig berichtete Steigerung der wertgebenden Inhaltsstoffe Öl und Protein in hellsamigen Rapsgenotypen, die sich in einer negativen Korrelation zwischen den betroffenen Merkmalen ausdrücken müsste, hier nicht gefunden wird. Dagegen wird in den untersuchten Winterrapspopulationen eine entgegengesetzte Situation beobachtet, die sich in einer zwar schwachen aber signifikanten, positiven Korrelation zwischen der Samenfarbe sowie den Faserkomponenten ADF und ADL mit dem Ölgehalt zeigt. Die Annahme einer generellen Ölgehaltssteigerung durch die Selektion hellsamiger Rapsgenotypen wird somit durch die vorliegenden Untersuchungen nicht unterstützt. Allein die NDF-Gehalte zeigen eine negative Korrelation mit dem Ölgehalt, die durch eine Konkurrenz für Kohlenstoff in der Fettsäurebiosynthese bzw. der Synthese der Zellwandgerüstsubstanzen Hemicellulose und Cellulose erklärbar ist.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch eine gleichzeitige Beachtung der Fasergehalte und des Ölgehaltes in einigen Individuen eine Reduktion der Fasergehalte bei gleichbleibendem Ölgehalt realisiert ist. Ferner ist in solchen Genotypen zudem eine Erhöhung des Proteingehaltes feststellbar, was aufgrund der gefundenen schwach negativen Korrelation zwischen der Samenfarbe, den Faserfraktionen und dem Proteingehalt zu



erwarten ist. Für die Qualitätszüchtung von Raps ist dies eine gute Voraussetzung, um eine Steigerung des Proteingehaltes zu realisieren, ohne dabei eine Verringerung des marktwertbestimmenden Ölgehaltes zu bekommen. Aufgrund der bekannten engen negativen Korrelation zwischen Öl- und Proteingehalt (vgl. Friedt *et al.* 2002), welche auch in dieser Arbeit gefunden wurde, ist eine gleichzeitige Steigerung beider Inhaltsstoffe meist nur schwer verwirklichtbar. Die aufgedeckten Zusammenhänge sind eine wertvolle Basis für die Züchtung von neuen Rapssorten mit einer deutlich verbesserten Schrotqualität sowie einem gesteigerten Futterwert. Durch eine Kombination von reduzierten Fasergehalten und erhöhtem Proteingehalt bei gleichbleibendem Ölgehalt in neuen Rapssorten kann zum einem deren Marktwert und zum anderem die Vermarktungsfähigkeit von Rapsschrot ggf. deutlich gesteigert werden.

### 4.3 Analytik phenolischer Samenschalenkomponenten

Ein unbefriedigender Futterwert des Rapsschrotes im Vergleich zum Konkurrenzprodukt Sojaschrot wird mit der Präsenz von verschiedenen phenolischen Komponenten mit teilweise antinutritivem Charakter in Verbindung gebracht (Naczki *et al.* 1998). Phenolische Komponenten in der Rapssaat sind neben den Faserkomponenten überwiegend in den Samenschalen lokalisiert (Marles & Gruber 2004), und daher ist die Analytik der Zusammensetzung der Samenschale von besonderem Interesse für eine Verbesserung der allgemeinen Samenqualität und der Schrotqualität von Körnerölraps (vgl. Friedt *et al.* 2002).

In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen der Arbeit auch eine Untersuchung der Zusammensetzung phenolischer Substanzen in Samen bzw. Samenschalen von genetisch diversen, an unsere Anbaubedingungen adaptierten schwarzsamigen Winterrapssorten durchgeführt. Die Bestimmung der phenolischen Komponenten wurde mittels einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) und vorangehenden Aufreinigungsschritten mit der Festphasen-Extraktion (solid phase extraction, SPE) durchgeführt. Mit dieser Methode konnten folgende phenolische Fraktionen untersucht werden: Phenolsäuren, in Raps überwiegend die Sinapinsäure und deren Cholinester (Sinapin) (vgl. Naczki *et al.* 1998); oligomerische Procyanidine und zuletzt die polymerischen Proanthocyanidine (kondensierte Tannine und andere pigmentierte Komplexe).

In den untersuchten Genotypen konnte zunächst eine signifikante positive Korrelation zwischen dem ADL-Gehalt und dem Gesamtgehalt an phenolischen Säuren gefunden werden. Die ADL-Fraktion beschreibt überwiegend den Anteil der phenolischen Komponente Lignin, welche durch eine Polymerisierung verschiedener Monolignol-Einheiten, d.s. Guaiacyl- (G),

Hydroxyphenyl- (H) und Syringyl- (S)-Monolignol, gebildet wird (Dixon *et al.* 2001). Die Einheiten gehen auf einzelne phenolische Säuren zurück, wobei insbesondere die S-Einheit auf die Sinapinsäure zurückgeht (Boerjan *et al.* 2003). In *Brassica*-Arten ist die Sinapinsäure die vorherrschende Phenolsäure und wird zum einem für die Synthese des Sinapincholins (Sinapin) und zum anderem für die Lignin-Biosynthese, speziell die S-Einheit verwendet (Naczek *et al.* 1998, Marles & Gruber 2004, Bhinu *et al.* 2009). Der Zusammenhang zwischen den Phenolsäuren und dem ADL-Gehalt ist somit durch gemeinsame Biosynthesewege erklärbar, und eine gleichzeitige Reduktion beider antinutritiver Inhaltsstoffe, Lignin und Sinapin, ist daher denkbar.

Der Einfluss der Sinapinsäure auf den ADL-Gehalt konnte in weiteren gemeinsamen Untersuchungen mit dem Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, bestätigt werden. In diesen Arbeiten wurden Rapsgenotypen mit unterschiedlichem ADL-Gehalt (vornehmlich hoch ADL und niedrig ADL) mit einer kombinierten Flüssigkeitschromatographie-Massenspektroskopie (LC-MS) bezüglich der Gehalte und der Zusammensetzung von verschiedenen phenolischen Substanzen und Ligninausgangsstoffen analysiert. Die gewonnenen Daten wurden mit den NIRS-Daten für ADL korreliert, um einerseits die Qualität der NIRS-Analytik zu überprüfen und andererseits einzelne phenolische Moleküle zu identifizieren, die in den Niedrig-ADL Linien reduziert sind. Die höchste Korrelation wurde wiederum zwischen dem ADL-Gehalt und den LC-MS-Werten für Sinapinsäure gefunden. Weitere aussagekräftige Zusammenhänge wurden zwischen ADL und noch nicht weiter bestimmten Ligninderivaten beobachtet (A. Frolov und B. Wittkop, unveröff.). Anhand dieser analytischen Vorgehensweise ist auf der Basis der bekannten Synthesewege die Identifizierung von Schlüsselenzymen der Ligninbiosynthese und möglicher Kandidatengene für das globale Zielmerkmal „reduzierter Fasergehalt“ vorstellbar.

Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung von Kandidatengenomen besteht in molekular-genetischen Analysen, wie z.B. einer QTL-Analyse (quantitative trait loci). Bei QTL-Analysen können unter Berücksichtigung der phänotypischen Daten für die betrachteten Merkmale einerseits und der genotypischen Daten (z.B. molekulare Markerdaten) andererseits Genombereiche identifiziert werden, die einen Einfluss auf die interessierenden Merkmale haben. Für verschiedene Rapspopulationen sind solche kombinierten Merkmalsloci für die relevanten antinutritiven Faserkomponenten und phenolischen Komponenten sowie die Samenfarbe auf dem Rapschromosom A9 lokalisiert worden (Badani *et al.* 2006, Fu *et al.* 2007, Lipsa *et al.* 2012, Liu *et al.* 2012). Es ist aber darauf hinzuweisen, dass QTL-Analysen in der Regel anhand biparentaler Kreuzungsnachkommenschaften durchgeführt werden und

somit die allelische Diversität für die interessierenden Merkmale gering ist; für jedes Gen liegen in der Regel nur zwei Allele vor. Es ist daher auf dieser Basis nicht möglich, allgemeingültige Aussagen über den Einfluss des betrachteten Genombereiches für eine Merkmalsausprägung in beliebigem *B. napus*-Material zu treffen. Hier ist die Durchführung sogenannter Assoziationsstudien anhand genetisch maximal diverser Rapsgenotypen (Linien, Wild-, Land- und Zuchtsorten) eine sehr nützliche Alternative zur QTL-Analyse, denn sie gestatten die Berücksichtigung einer möglichst breiten allelischen Diversität (Ecke *et al.* 2010).

So dienten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen phänotypischen Daten der verschiedenen Samenschalenkomponenten des diversen schwarzsamigen Winterrapsmaterials als Grundlage zur Durchführung einer Assoziationsstudie unter spezieller Betrachtung des zuvor beschriebenen Genombereichs auf dem *B. napus*-Chromosom A9. Die Studie zeigte, dass die molekularen Marker in diesem Genombereich eine hohe Assoziation mit den interessierenden antinutritiven Samenschalenmerkmalen aufweisen. Es konnten molekulare Marker identifiziert werden, die beispielsweise gleichermaßen mit der Samenfarbe, dem NDF-Gehalt, den phenolischen Säuren sowie den Proanthocyanidinen assoziiert sind. Die Assoziationsstudie ermöglichte so die Aufdeckung einer prominenten Genomregion, die nicht allein in für Samenfarbe spaltenden Populationen vorzufindenden ist, sondern einen generellen, maßgeblichen Einfluss auf die Schrotqualität von Körnerölraps hat.

#### **4.4 Vererbung des Fasergehaltes als Grundlage für die Züchtung auf reduzierte Fasergehalte in Raps**

Ein Maß für die Erbllichkeit eines Merkmals ist die Heritabilität ( $h^2$ ), die neben den eigentlichen Genwirkungen auf den Phänotyp auch die umweltbedingten Effekte bzgl. der Merkmalsausprägung und Genotyp-Umwelt-Interaktionen mit berücksichtigt. Für die Berechnung der Heritabilität sind phänotypische Daten der interessierenden Merkmale aus mehrjährigen und mehrortigen (Feld-)Versuchen notwendig, um verlässliche Berechnungen durchführen zu können.

Die so berechneten Heritabilitäten für NDF, ADF und ADL zeigen, dass die einzelnen Faserkomponenten und insbesondere der ADL-Gehalt in dem untersuchten Rapsmaterial hoch heritabel sind. Hohe Heritabilitäten findet man in der Regel für weniger komplex vererbte Merkmale, und hohe  $h^2$ -Werte sind in multiplen Prüfungen genetisch fixierter DH-Linien nicht ungewöhnlich. Die Merkmalsverteilung für den ADL-Gehalt innerhalb der YE2-DH Population zeigt eine Verschiebung in Richtung niedriger ADL-Gehalte und lässt aufgrund

der Spaltung eine dominante Vererbung des Merkmals vermuten; eine klare 3:1 Spaltung für niedrige bzw. hohe ADL-Gehalte konnte jedoch nicht statistisch abgesichert werden. Dennoch berichten Liu *et al.* (2012) über eine dominante Vererbung des ADL-Gehaltes in den Nachkommen einer Rückkreuzungspopulation, die auf eine Kreuzung zwischen einer gelben und schwarzen Rapsform zurückgeht. Die Dominanz niedriger ADL-Gehalte in Raps wird durch eine digenische Vererbung des Merkmals erklärt, wobei offenbar zwei wichtige Schlüsselenzyme der Ligninbiosynthese, nämlich *CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE* (CAD) und *CINNAMOYL CoA REDUCTASE* (CCR), beteiligt sind. Für Tabak berichteten Chabannes *et al.* (2001), dass durch ein Zusammenspiel der beiden genannten Enzyme eine veränderte Ligninbiosynthese mit drastischen Reduktionen im Ligningehalt der Pflanze beobachtet werden kann. Die dominante Vererbung des Ligningehaltes kommt aber nur dann zustande, wenn eine *loss of function*-Mutation für beide Enzyme, CAD und CCR, vorliegt. Liu *et al.* (2012) berichten, dass in dem gelbsamigen Elter der von ihnen untersuchten Rapsgenotypen eine solche Mutation für das CCR-Gen vorliegt und schlussfolgern, dass aufgrund der dominanten Vererbung eines niedrigen ADL-Gehaltes dann ebenfalls ein unwirksames CAD-Enzym in beiden Elternteilen vorhanden sein muss. Folglich kann vermutet werden, dass insbesondere in den meisten hell-samigen Rapsformen eine Mutation beider samen-exprimierter Enzyme vorliegen muss, die einerseits eine Reduktion der Samenschalendicke und andererseits des Ligningehaltes bedingen. Die niedrigsten Fasergehalte werden hauptsächlich in diesen Genotypen gefunden. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass hell-samige Genotypen einerseits aufgrund der starken Umweltabhängigkeit für die Samenfarbe keine stabile Merkmalsausprägung zeigen und andererseits bezüglich der Hektarerträge deutlich unter den schwarz-samigen Sorten liegen. Trotz allem sind die hell-samigen Genotypen jedoch für die Selektion auf reduzierte Fasergehalte und die Züchtung von neuen, in der Schrotqualität verbesserten Rapsorten als Kreuzungspartner brauchbar und nützlich. Hierbei muss aber nun beachtet werden, dass bei der Verwendung einer hell- bzw. gelbsamigen Linie der jeweilige schwarz-samige Kreuzungspartner auch gewisse Eigenschaften besitzen muss, die man als „Rezeptoreigenschaften“ beschreiben könnte; dabei geht es um die optimale genetische Konstitution bzgl. der beschriebenen Enzyme. Soll in den Nachkommenschaften der bearbeiteten Kreuzungen eine dominante Vererbung für niedrige ADL-Gehalte vorliegen, so muss der schwarz-samige Kreuzungspartner in mindestens einem der beiden Enzyme ebenfalls die Allele für ein nicht funktionstüchtiges Enzym aufweisen. Erklärbar ist dieser Sachverhalt anhand von Beobachtungen bei Tabak, wo eine dominante Vererbung des Ligningehaltes

nicht zum Tragen kommt, wenn für eines der beiden Enzymgene Heterozygotie und gleichzeitig im jeweils anderen Enzymlocus kein Verlust der Funktion vorliegt (Chabannes *et al.* 2001).

Insbesondere in der Entwicklung neuer Hybridsorten mit verbesserten Schroteigenschaften ist die Nutzung einer dominanten Vererbung für niedrige ADL-Gehalte notwendig. Sowohl in der F1- als auch in der F2-Generation, die das Erntegut der Hybridsorte darstellt, kann bei einer dominanten Vererbung eine verbesserte Schrotqualität realisiert werden. Für die Auswahl der jeweiligen Hybrid-Eltern ist daher eine hinreichende Information über die genetische Ausstattung hinsichtlich der CCR- und CAD-Enzyme sehr nützlich. In diesem Zusammenhang schlagen Liu *et al.* (2012) die Nutzung von molekularen Markern vor, die eine Differenzierung verschiedener Situationen an den Enzym-Loci für die Selektion der Kreuzungspartner ermöglichen. Eigene Beobachtungen bei Nachkommenschaften verschiedener Kreuzungen weisen daraufhin, dass eine Selektion von Kreuzungspartnern mit einer hohen Kombinationseignung auch mit Hilfe von Testkreuzungen durchführbar ist. Allerdings ist hierbei darauf hinzuweisen, dass solche Testkreuzungen zeit- und kostenintensiv sind. Eine Kombination von Testkreuzungen, phänotypischen Analysen mittels der neu erstellten NIRS-Kalibrationen und der Einsatz marker-gestützten Selektion lassen die größten Erfolge für eine effektive Selektion der besten Hybrid-Eltern erwarten.

Wie die vorgestellten Untersuchungen der verschiedenen Rapspopulationen zeigen, ist eine starke Variation für ADL-Gehalte in schwarzsamigen DH-Linien der ExV8-DH Population und auch in schwarzsamigen Winterrapssorten zu finden. Solche schwarzsamigen Genotypen mit reduziertem ADL-Gehalt stellen potentielle Kreuzungspartner dar und können aufgrund der neu entwickelten NIRS-Kalibration für Fasergehalte auch hinreichend exakt selektiert werden. Weiterhin ist die transgressive Vererbung des ADL-Gehaltes in der ExV8-DH eine notwendige Grundlage für die erfolgreiche Sortenzüchtung zur Entwicklung neuer Rapssorten mit verbesserter Schrotqualität aufgrund einer höheren Verdaulichkeit.

Durch die Verwendung der neu entwickelten NIRS-Kalibrationen für die Faserfraktionen war ein umfassendes Screening, speziell für den ADL-Gehalt, in dem zur Verfügung stehenden Winterrapssortenmaterial realisierbar. Die dadurch gewonnenen Daten konnten genutzt werden, um zum einen die vorhandene genetische Variation zu identifizieren und zum anderen neue Kreuzungspartner zu identifizieren, mit denen eine günstige Kombination aller relevanter Inhaltsstoffe in Raps möglich ist. In diesem Zusammenhang wurden verschiedene Kreuzungen zwischen schwarzsamigen Rapssorten, welche sich nicht nur für den Fasergehalt, sondern auch für den Öl- und Proteingehalt unterscheiden, erstellt. Innerhalb der

---

Nachkommenschaften ist eine Aufspaltung aller interessierenden Inhaltsstoffe zu erwarten, die eine Selektion von Linien und Sortenkandidaten mit einer deutlich verbesserten inneren Samen- und Schrotqualität ermöglichen. Weiterhin ist die Erstellung zusätzlicher DH-Populationen aus den durchgeführten Kreuzungen eine wertvolle Grundlage für zukünftige genetische Untersuchungen der Samenschalen- und Schrotmerkmale in *B. napus*.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In den letzten Jahren ist eine gesteigerte Anbaufläche von Raps (*Brassica napus*), begründet durch eine Nachfragesteigerung nach Rapsöl für die Biodieselproduktion, in Deutschland und innerhalb der EU erkennbar. Dadurch stellen sich neue Herausforderungen für die Pflanzenzüchtung bezüglich Ölertrag und –qualität und insbesondere der Schrotqualität, um vor allem das Rapsschrotes, als Rückstand der Ölextraktion, als hochwertiges Eiweißfuttermittel in der Tierernährung vollwertig zu nutzen. Rapsschrot enthält ca. 40% Protein mit einer günstigen Aminosäuren-Zusammensetzung und hohen Anteilen essentieller Aminosäuren, wie z.B. Methionin und Cystein. Aufgrund eines relativ hohen Rohfasergehaltes und der Präsenz weiterer antinutritiver Sameninhaltsstoffe, wie z.B. Sinapin und kondensierte Tannine, kann herkömmliches Rapsschrot aber nur bedingt in der Fütterung von Nutztieren eingesetzt werden. Um nun die Verwendungsmöglichkeiten weiter zu steigern, müssen die Gehalte der wertmindernden Inhaltsstoffe, wie Rohfaser (u.a. Lignin, Hemicellulose und Cellulose) und anderer wertmindernder phenolischer Substanzen (u.a. Tannine und Sinapine), reduziert werden. Hinsichtlich der Reduktion solcher wertmindernder Inhaltsstoffe wird aus Sicht der Pflanzenzüchtung der Entwicklung gelb- bzw. hellsamiger Rapsgenotypen eine große Bedeutung beigemessen, indem die Rohfaser reduziert und die innere Samenqualität dadurch deutlich verbessert wird.

In diesem Zusammenhang ist aber in der praktischen Pflanzenzüchtung die Erfassung möglichst vieler relevanter und antinutritiver Sameninhaltsstoffe, wie z.B. Rohfaser, mittels Hochdurchsatz-Analysemethoden eine notwendige Voraussetzung für die erfolgreiche Selektion neuer Rapsgenotypen mit verbesserter Schrotqualität. Das wesentliche Ziel der Arbeit bestand darin, durch die Entwicklung von Kalibrationen für die Nahinfrarot-Reflektionsspektroskopie (NIRS) der Faserfraktionen NDF (*neutral detergent fibre*), ADF (*acid detergent fibre*) und ADL (*acid detergent lignin*) für verschiedene Samenvolumina (10ml und 1ml) in intakten *B. napus* Samen, solche umfassenden Analysemethoden bereit zu stellen. Es konnte gezeigt werden, dass die NIRS-Kalibrationen für die Faserkomponenten, speziell für die ADL-Bestimmung, hinreichend genau sind und ein großes Potential für die züchterische Selektion von neuen Linien und Sorten, sowohl in jungen als auch in fortgeschrittenen Zuchtmaterial, mit verbesserter Schrotqualität aufweisen.

Weiterhin wurden die neu entwickelten NIRS-Kalibrationen genutzt, um einerseits die vorhandene genetische Variation für die Faserkomponenten in unterschiedlichen für Samenfarbe bzw. Schrotqualität spaltenden Winterrapspopulationen zu analysieren.

Andererseits dienten die erzielten phänotypischen Daten als Grundlage für quantitativ- und molekular-genetische Untersuchungen, um genauere Kenntnisse über die Vererbung sowie die genetischen Assoziation mit anderen Samenschalenmerkmalen, wie z.B. der Samenfarbe und den kondensierten Tanninen, in der Rapssaat zu erlangen.

Aus den Untersuchungen wurde deutlich, dass ein starker Zusammenhang zwischen der Samenfarbe und den verschiedenen Faserkomponenten in *B. napus* existiert, und dass die niedrigsten Fasergehalte in hellsamigen Genotypen zu finden sind. Bemerkenswert sind aber auch die zu beobachtende breite Variation für, beispielsweise ADL, in schwarzsamigen Rapsgenotypen einerseits und die Identifizierung eines gemeinsamen Genombereiches auf dem *B. napus*-Chromosom A9, der die genetischen Zusammenhänge der verschiedenen Samenschalenmerkmale erklärt, andererseits.

Die in dieser Arbeit erstellten Analysemethoden für die Faserfraktionen der Rapssaat und die gewonnenen Erkenntnisse über die genetischen Zusammenhänge von Sameninhaltsstoffen, die einen maßgeblichen Einfluss auf die Schrotqualität haben, stellen wertvolle Informationen für die Züchtung von in der Schrotqualität verbesserten Rapssorten dar, mit denen eine Steigerung der dualen Verwertbarkeit von Körnerölraps für die Ölgewinnung und die Tierfütterung realisierbar ist.



## 6 SUMMARY

Oilseed rape (*Brassica napus*) meal or cake is an important product for livestock nutrition. With constantly rising seed production in Europe due to higher demands for vegetable oil and biodiesel, an improvement of the seed meal quality is an increasingly important breeding aim in order to increase the overall economic value of the crop. Oilseed rape meal possesses about 40% protein with a favorable composition of amino acids, and high contents of essential amino acids like methionin and cystein. However the utilisation of rapeseed meal in animal nutrition is limited by its high content of undigestible and antinutritive fibre components and additionally high quantities of other phenolic compounds, such as sinapine and condensed tannins. Until now most efforts to select for improved meal quality have concentrated on the use of the yellow seed trait as a selection marker for reduced contents of fibre and condensed tannins.

In modern breeding programs the use of high-throughput analysis for all relevant valuable and antinutritive seed compounds, such as fibre, is necessary for a successful selection of oilseed rape genotypes with an improved meal quality. In this regard the development of near infrared reflection spectroscopy (NIRS) calibration for fibre fractions NDF (neutral detergent fibre), ADF (acid detergent fibre) and ADL (acid detergent lignin) in different seed volumes (10ml and 1ml) of intact *B. napus* seeds was the main aim of this study. It could be shown that accurate calibrations were obtained for ADL, the major antinutritional fibre fraction in oilseed rape meal, and adequate calibrations for NDF and ADF in both seed volumes. The new developed calibrations demonstrate the power of NIRS for the selection of genotypes with an improved meal quality in early and advanced breeding generations.

Evaluation of diverse *B. napus* germplasm with the new calibrations revealed a surprisingly broad variation of ADL content in dark-seeded oilseed rape, whereas the lowest fibre contents could be observed in yellow-seeded genotypes. Furthermore the obtained phenotypic data were used for genetic studies to investigate the inheritance and the association of seed fibre components with other seed coat traits, such as seed coat colour and other phenolic compounds. The results demonstrate that a major genome region on *B. napus* chromosome A9 is simultaneously influencing a number of seed coat traits.

The new developed NIRS-calibrations for NDF, ADF and ADL as well as the obtained information about the inheritance of seed fibre and the genetic association of several antinutritive seed components represents an important breakthrough in breeding for improved nutritional quality of seed extraction meals from oilseed rape.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbadi, A.; Leckband, G. Rapeseed breeding for oil content, quality, and sustainability. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2011**, *113*, 1198-1206.
- Akhov, L.; Ashe, P.; Tan, Y.; Datla, R.; Selveraj, G. Proanthocyanidin biosynthesis in the seed coat of yellow-seeded, canola quality *Brassica napus* YN01-429 is constrained at the committed step catalyzed by dihydroflavonol 4-reductase. *Botany* **2009**, *87*, 616-625.
- Badani, A.G.; Snowdon, R.J.; Wittkop, B.; Lipsa, F.D.; Baetzel, R.; Horn, R.; De Haro, A.; Font, R.; Lühs, W.; Friedt, W. Colocalization of a partially dominant gene for yellow seed colour with a major QTL influencing acid detergent fibre (ADF) content in different crosses of oilseed rape (*Brassica napus*). *Genome* **2006**, *49*, 1499-1509.
- Baetzel, R.; Friedt, W.; Lühs, W. Yellow-seeded high-erucic acid rapeseed (*Brassica napus* L.) as a source of improved industrial raw materials. In: Proceedings 6<sup>th</sup> Symp. Renewable Resources & 4<sup>th</sup> Eur. Symp. Industrial Crops and Products, *Landwirtschaftsverl.*, Münster, **1999**, 407-412.
- Barth, C.A.; Metges, C.C. Nutzung von Rapsprotein in der Humanernährung. In: Rapsprotein in der Humanernährung, *UFOP-Schriften Heft 32*, **2007**.
- Bechyne, M. Breeding and some biological properties of yellow seeded winter rapeseed (*Brassica napus* L.). In: Proceedings of 7<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Poznan, Poland, **1987**, *2*, 481-491.
- Bell, J.M. Factors affecting the nutritional value of canola meal: A review. *Can. J. Anim. Sci.* **1993**, *73*, 679-697.
- Bell, J.M. Meal and by-product utilization in animal nutrition. In: Kimber D.; McGregor D.I. (eds.). *Brassica Oilseeds - Production and Utilization*, CAB Intern., Wallingford, UK, **1995**, 301-337.
- Bengtsson, L. Some experiences of using different analytical methods in screening for oil and protein content in rapeseed. *Fette Seifen Anstrichmittel* **1985**, *87*, 262-265.
- Bhinu, V.S.; Schäfer, U. A.; Li, R.; Huang, J.; Hannoufa, A. Targeted modulation of sinapine biosynthesis for seed quality improvement in *Brassica napus*. *Transgenic Res.* **2009**, *19*, 31-44.
- Boerjan, W.; Ralph, J.; Baucher, M. Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **2003**, *54*, 519-546.

- Bos, C.; Airinei, G.; Mariotti, F.; Benamouzing, R.; Berot, S.; Evrard, J.; Fenart, E.; Tome, D.; Gaudichon, C. The poor digestibility of rapeseed protein is balanced by its very high metabolic utilization in humans. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 594-600.
- Chabannes, M.; Barakate, A.; Lapierre, C.; Marita, J.M.; Ralph, J.; Pean, M.; Danoun, S.; Halpin, C.; Grima-Pettenati, J.; Boudet A.M. Strong decrease in lignin content without significant alteration of plant development is induced by simultaneous down-regulation of *cinnamoyl CoA reductase* (CCR) and *cinnamyl alcohol dehydrogenase* (CAD) in tobacco plants. *The Plant Journal* **2001**, *28*, 257-270.
- Chai, Y.; Lei, B.; Huang, H.; Li, J.; Yin, J.; Tang, Z.; Wang, R.; Chen, L. *TRANSPARENT TESTA 12* genes from *Brassica napus* and parental species: cloning, evolution, and differential involvement in yellow seed trait. *Mol. Genet. Genomics* **2009**, *281*, 109-123.
- Chen, L.; Li, J.; Tang, Z.; Zhang, X.; Chen, Y.; Yin, J. Breeding of 'Yuhuang1' – A new yellow-seeded hybrid cultivar of rape (*Brassica napus* L.). *Journal of Southwest Agricultural University* **2002**, *24*.
- Clauß, K.; Baumert, A.; Nimtz, M.; Milkowski, C.; Strack, D. Role of GDSL lipase-like protein as sinapine esterase in *Brassicaceae*. *Plant J.* **2008**, *53*, 802-813.
- Clauß, K.; von Roepenack-Lahaye, E.; Böttcher, C.; Roth, M.R.; Welti, R.; Erban, A.; Kopka, J.; Scheel, D.; Milkowski, C.; Strack, D. Overexpression of Sinapine Esterase *BnSCE3* in oilseed rape seeds triggers global change in seed metabolism. *Plant Physiology* **2011**, *155*, 1127-1145.
- Devic, M.; Guillemot, J.; Debeaujon, I.; Bechtold, N.; Bensaude, E.; Koornneef, M.; Pelletier, G.; Delseny, M. The *BANYULS* gene encodes a DFR-like protein and is a marker of early seed coat development. *Plant J.* **1999**, *19*, 387-398.
- Dixon, R. A.; Chen, F.; Guo, D.; Parvathi, K. The biosynthesis of monolignols; a „metabolic grid“, or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry* **2001**, *57*, 1069-1084.
- Downey, R.K.; Bell, J.M. New developments in canola research. In: Shahidi F. (ed), *Canola and Rapeseed. Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology*, Van Nostrand Reinhold, New York, **1990**, 37-46.
- Downey, R.K.; Harvey, B.L. Methods of breeding for oil quality in rape. *Can. J. Plant Sci.* **1963**, *43*, 271-275.
- Durkee, A.B. The nature of tannin in rapeseed (*Brassica campestris*). *Phytochemistry* **1971**, *10*, 1583-1585.

- Ecke, W.; Clemens, R.; Honsdorf, N.; Becker, H.C. Extent and structure of linkage disequilibrium in canola quality winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **2010**, *120*, 921-931.
- Eynck, C.; Koopmann, B.; Karlovsky, P.; von Tiedemann, A. Internal resistance in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen *Verticilium longisporum*. *Phytopathology* **2009**, *99*, 802-811.
- Fenwick, G.R.; Heaney, R.K.; Mullin, J. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutrit.* **1983**, *18*, 123-201.
- Font, R.; Del Rio, M.; Fernandez, J.M.; De Haro, A. Acid detergent fibre analysis in oilseed *Brassicas* by near-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 2917-2922.
- Font, R.; Wittkop, B.; Badani, A.G.; Del Rio-Celestino, M.; Friedt, W.; Lühs, W.; De Haro-Baillon, A. The measurements of acid detergent fibre in rapeseed by visible and near-infrared spectroscopy. *Plant Breeding* **2005**, *124*, 410-412.
- Font, R.; Del-Rio Celestino, M.; De Haro-Bailon, A. The use of near-infrared spectroscopy (NIRS) in the study of seed quality components in plant breeding programs. *Industrial Crops and Products* **2006**, *24*, 307-313.
- Friedt, W.; Baetzel, R.; Badani, A.G.; Koch, M.; Schmidt, R.; Horn, R.; Lühs, W. Züchtung auf optimierte Schrotqualität bei Raps (*Brassica napus*). *Vortr. Pflanzenzüchtg.* **2002**, *54*, 131-143.
- Fu, F.; Liu, L.; Chai, Y.; Chen, L.; Yang, T.; Jin, M.; Ma, A.; Yan, X.; Zhang, Z.; Li, J. Localization of QTLs for seed color using recombinant inbred lines of *Brassica napus* in different environments. *Genome* **2007**, *50*, 840-854.
- Harvey, B.L.; Downey, R.K. The inheritance of erucic acid content in rapeseed (*Brassica napus*). *Can. J. Plant Sci.* **1964**, *44*, 104-111.
- Heenen, W.K.; Brismar, K. Maternal and embryonal control of seed colour by different *Brassica alboglabra* chromosomes. *Plant Breeding* **2001**, *120*, 325-329.
- Henderson, C.A.P.; Pauls, K.P. The use of haploidy to develop plants that express several recessive traits using light-seeded canola (*Brassica napus*) as an example. *Theor. Appl. Genet.* **1992**, *83*, 476-479.
- Henneberg, W.; Strohmman, F.J. *Landw.* **1859**, *3*, 445.
- Hüsken, A.; Baumert, A.; Strack, D.; Becker, H.C.; Möllers, C.; Milkowski, C. Reduction of sinapate ester content in transgenic oilseed rape (*Brassica napus*) by dsRNAi-based suppression of *BnSGT1* gene expression. *Molecular breeding* **2005**, *16*, 127-138.

- Ismail, F.; Vaisey-Genser, M.; Fyfe, B. Bitterness and adstringency of sinapine and its components. *J. Food Sci.* **1981**, *46*, 1241-1244.
- Jeroch, H.; Jankowski, J.; Schöne, F. Rapsfuttermittel in der Broiler- und Legehennenfütterung. *Arch. Geflügelk.* **2008**, *72*, 49-55.
- Kays, S.E.; Windham, W.R.; Franklin, E.B. Prediction of total dietary fiber by near-infrared reflectance spectroscopy in high-fat- and high-sugar-containing cereal products. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 854-861.
- Kleindt, C.K.; Stracke, R.; Mehrtens, F.; Weishaar, B. Expression analysis of flavonoid biosynthesis genes during *Arabidopsis thaliana* silique and seed development with a primary focus on the proanthocyanidin biosynthetic pathway. *BMC Research Notes* **2010**, *3*, 255.
- Koester, S. Methodische Untersuchungen zum Einsatz der Nahinfrarot-Reflexionsspektroskopie (NIRS) in der Körnerrapszüchtung. *Landbauforschung Völkenrode* **1989**, Sonderheft 98.
- Kozłowska, H.; Naczka, M.; Shahidi, F.; Zadernowski, R. Phenolic acids and tannins in rapeseed and canola. In: Shahidi, F. (ed), Canola and Rapeseed. Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology, Van Nostrand Reinhold, New York, **1990**, 193-210.
- Kong, X.; Xie, J.; Wu, X.; Huang, Y.; Boa, J. Rapid prediction of acid detergent fibre, neutral detergent fibre, and acid detergent lignin of rice materials by near-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 2843-2848.
- Kracht, W.; Dänicke, S.; Kluge, H.; Keller, K.; Matzke, W.; Henning, U.; Schumann, W. Effect of dehulling of rapeseed on feed value and nutrient digestibility of rape products in pigs. *Archives of Animal Nutrition* **2004**, *58*, 389-404.
- Kramer, J.K.G.; Sauer, F.D.; Pigdem, W.J. The problems associated with feeding high erucic acid rapeseed oils and some fish oils to experimental animals. In: Sauer, F.D.; Kramer, J.K.G. (eds.). High and low erucic acid rapeseed oils. Academic Press, Toronto, Canada, **1983**, 254-292.
- Krause, J.P.; Kroll, J.; Rawel H.M. Verarbeitung von Rapssaat – Eigenschaften und Gewinnung von Proteinen. In: Rapsprotein in der Humanernährung, *UFOP-Schriften Heft 32*, **2007**.
- Kuras, M.; Stefanowska-Wronka, M.; Lynch, J. M.; Zobel, A. M. Cytochemical localization of phenolic compounds in columella cells of the root cap in seeds of *Brassica napus* – Changes in the localization during germination. *Annals of Botany* **1999**, *84*, 135-143.

- Lepiniec, L.; Debeaujon, I.; Routaboul, J.M.; Baudry, A.; Pourcel, L.; Nesi, N.; Caboche, M. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2006**, *57*, 405-430.
- Leung, J.; Fenton, T.W.; Mueller, M. M.; Clandinin, D. R. Condensed tannins of rapeseed meals. *J. Food Sci.* **1979**, *44*, 1313-1316.
- Liang, M.; Davis, E.; Gardner, D.; Cai, X.; Wu, Y. Involvement of *AtLAC15* in lignin synthesis in seeds and root elongation of *Arabidopsis*. *Planta* **2006**, *224*, 1185-1196.
- Lindermayer, H.; Preißinger, W.; Propstmeier, G. Schweinefütterung mit heimischen Eiweißfuttermittel. Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), Freising-Weihenstephan, Deutschland, **2010**.
- Lipsa, D.; Snowdon, R.; Friedt, W. Quantitative genetic analysis of condensed tannins in oilseed rape meal. *Euphytica* **2012**, *184*, 195-205.
- Liu, X.P.; Tu, J.X.; Chen, B.Y.; Fu, T.D. Identification and inheritance of a partially dominant gene for yellow seed color in *Brassica napus*. *Plant Breeding* **2005**, *124*, 9-12.
- Liu, L.; Meng, J.; Lin, N.; Chen, L.; Tang, Z.; Zhang, X.; Li, J. QTL mapping of seed coat color für yellow seeded *Brassica napus*. *Acta Genetica Sinica*, **2006**, *33*, 181-187.
- Liu, L.; Stein, A.; Wittkop, B.; Sarvari, P.; Li, J.; Yan, X.; Dreyer, F.; Frauen, M.; Friedt, W.; Snowdon, R.J. A knockout mutation in the lignin biosynthesis gene *CCR1* explains a major QTL for acid detergent lignin content in *Brassica napus* seeds. *Theor. Appl. Genet.* **2012**, doi:10.1007/s00122-012-1811-0.
- Lühs, W.; Baetzel, R.; Friedt, W. Genetic analysis of seed color in rapeseed (*Brassica napus* L.). *J. Genet. Plant Breed.* **2000**, *36*, 111-115.
- Malabat. C.; Atterby, H.; Chaudhry, Q.; Renard, M.; Guéguen, J. Genetic variability of rapeseed protein composition. In: Proceedings of 11<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Copenhagen, **2003**, *2*, 205–208.
- Marles, S.; Gruber, M.Y. Histochemical characterisation of unextractable seed coat pigments and quantification of extractable lignin in the Brassicaceae. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 251-262.
- Matthäus, B. Effect of dehulling on the composition of antinutritive compounds in various cultivars of rapeseed. *Fett/Lipid* **1998**, *100*, 295-301.
- Meng, J.; Shi, S.; Gan, L.; Li, Z.; Qu, X. The production of yellow-seeded *Brassica napus* (AACC) through crossing interspecific hybrids *B. campestris* (AA) and *B. carinata* (BBCC) with *B. napus*. *Euphytica* **1998**, *103*, 329-333.

- Milkowski, C.; Baumert, A.; Strack, D. Cloning and heterologous expression of a rape cDNA encoding UDP-glucose:sinapate glucosyltransferase. *Planta* **2000a**, *211*, 883-886.
- Milkowski, C.; Baumert, A.; Strack, D. Identification of four *Arabidopsis* genes encoding hydroxycinnamate glucosyltransferases. *FEBS Lett* **2000b**, *486*, 183-184.
- Milkowski, C.; Baumert, A.; Schmidt, D.; Nehlin, L.; Strack, D. Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *Plant J.* **2004**, *38*, 80-92.
- Naczek, M.; Nicholas, T.; Pink, D.; Sosulski, F. Condensed tannins in canola hulls. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2196-2200.
- Naczek, M.; Amarowicz, R.; Sullivan, A.; Shahidi, F. Current research developments on polyphenolics of rapeseed/canola: A review. *Food Chemistry* **1998**, *62*, 489-502.
- Naczek, M.; Amarowicz, R.; Pink, D.; Shahidi, F. Insoluble condensed tannins of canola/rapeseed. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1758-1762.
- Nesi, N.; Lucas, M.O.; Auger, B.; Baron, C.; Lecureuil, A.; Guerche, P.; Kronenberger, J.; Lepiniec, L.; Debeaujon, I.; Renard, M. The promoter of the *Arabidopsis thaliana* *BAN* gene is active in proanthocyanidin-accumulating cells of the *Brassica napus* seed coat. *Plant Cell Rep.* **2009**, *28*, 601-617.
- Pearson, A.W.; Butler, E.J.; Fenwick, R.G. Rapeseed meal and egg taint: the role of sinapine. *J. Sci. Food Agric.* **1980**, *31*, 898-904.
- Pourcel, L.; Routaboul, J.M.; Kerhoas, L.; Caboche, M.; Lepiniec, L.; Debeaujon, I. *TRANSPARENT TESTA 10* encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *The Plant Cell* **2005**, *17*, 2966-2980.
- Qi, C.K.; Fu, S.Z.; Pu, H.M. A successful transfer of yellow-seeded trait from *Brassica carinata* to *B. napus*. In: Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Cambridge, **1995**, *4*, 1137-1140.
- Qiao, H.; Classen, H.L. Nutritional and physiological effects of rapeseed meal sinapine in broiler chickens and its metabolism in the digestive tract. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, *83*, 1430-1438.
- Quiniou, N.; Crepon, K.; Quinsac, A.; Evrard, J.; Peyronnet, C.; Bourdillon, A.; Royer, E.; Etienne, M. Long-term performances of mixed-parities sows fed with 10% regular rapeseed meal during gestation and lactation. *Bulletin GCIRC* **2009**, *25*, 8p.

- Rahman, M. H.; Joersbo, M.; Poulsen, M. H. Development of yellow seeded *Brassica napus* of double low quality. *Plant Breeding* **2001**, *120*, 473-478.
- Rahman, M.; Li, G.; Schroeder, D.; McVetty, P.B.E. Inheritance of seed coat color genes in *Brassica napus* (L.) and tagging the genes using SRAP, SCAR and SNP molecular markers. *Mol. Breeding* **2010**, *26*, 439-453.
- Rahman, M.; McVetty, P.B.E. A review of *Brassica* seed colour. *Can. J. Plant Sci.* **2011**, *91*, 437-446.
- Rashid, A.; Rakow, G.; Downey, R.K. Development of yellow seeded *Brassica napus* through interspecific crosses. *Plant Breeding* **1994**, *112*, 127-134.
- Rotollo, P. Near infrared reflectance instrumentation. *Cereal Foods World* **1974**, *24*, 94-98.
- Schöne, F. Anforderungen der Tierernährung an die Rapszüchtung. *Fat Sci. Technol.* **1993**, *95*, 147-154.
- Schweizer, M.; Segall, K.; Medina, S.; Willardsen, R.; Tergesen, J. Rapeseed/canola protein isolates for use in the food industry. In: Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Conference of Rapeseed Congress, Wuhan, China **2007**.
- Schwenke, K. D. Structural studies on native and chemically modified storage proteins from rapeseed (*Brassica napus* L.) and related plant proteins. *Nahrung* **1990**, *34*, 225-240.
- Shahidi, F.; Naczk, M. An overview of the phenolics of canola and rapeseed: chemical, sensory and nutritional significance. *JAOCs* **1992**, *69*, 917-924.
- Shirzadegan, M. Inheritance of seed color in *Brassica napus*. *Z. Pflanzenzüchtg.* **1986**, *96*, 140-146.
- Shirzadegan, M.; Röbbelen, G. Influence of seed color and hull proportion on quality properties of seeds in *Brassica napus* L. *Fette-Seifen-Anstrichm.* **1985**, *87*, 235-237.
- Simbaya, J.; Slominski, B.A.; Rakow, G.; Campbell, L.D.; Downey, R.K.; Bell, J.M. Quality characteristics of yellow-seeded *Brassica* seed meals: Protein, carbohydrates, and dietary fiber components. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43* (8), 2062-2066.
- Slominski, B.A.; Campbell, L.D.; Guenter, W. Carbohydrates and dietary fibre components of yellow and brown-seeded canola. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 704-707.
- Slominski, B.A.; Simbaya, J.; Campbell, L.D.; Rakow, G.; Guenter, W. Nutritive value for broilers of meals derived from newly developed varieties of yellow-seeded canola. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1999**, *78*, 249-262.
- Somers, D.J.; Rakow, G.; Prabhu, V.K.; Friesen, K.R.D. Identification of a major gene and RAPD markers for yellow seed coat colour in *Brassica napus*. *Genome* **2001**, *44*, 1077-1082.



- Spiekers, H.; Südekum, K.H. Einsatz von 00-Rapsextraktionsschrot beim Wiederkäuer. In: *UFOP Praxisinformationen* **2004**.
- Stefansson, B.R.; Hougen, F.W.; Downey, R.K. Note on the isolation of rape plants with seed oil free from erucic acid. *Can. J. Plant Sci.* **1961**, *41*, 218-219.
- Stringam, G.R.; McGregor, D.I.; Pawlowski, S.H. Chemical and morphological characteristics associated with seedcoat color in rapeseed. In: Proceedings of 4<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Gießen, Germany, **1974**, 99-108.
- Theander, O.; Åman, P.; Miksche, G.E.; Yasuda, S. Carbohydrates, polyphenols and lignin in seed hulls of different colors from turnip rapeseed. *J. Agric. Food Chem.* **1977**, *25*, 270-273.
- Thies, W. Die wertbestimmenden Komponenten des Rapsschrotes. *Vortr. Pflanzenzüchtg.* **1994**, *30*, 89-97.
- Tillmann, P. Recent experiences with NIRS analysis in rapeseed. *GCIRC bulletin* **1997a**, *13*, 84-87.
- Tillmann, P. The analysis of rapeseed (*Brassica napus* L.) in a network of NIRS instruments. *GCIRC bulletin* **1997b**, *14*, 142-147.
- Tkachuk, R. Oil and Protein analysis of whole rapeseed kernels by near infrared reflectance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**, *58*, 819-822.
- U, N. Genome-Analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and its peculiar mode of fertilization. *Japan J. Bot.* **1935**, *7*, 389-452.
- Van Deynze, A.E.; Beversdorf, W.D.; Pauls, K.P. Temperature effects on seed color in black- and yellow-seeded rapeseed. *Can. J. Plant Sci.* **1993**, *73*, 383-387.
- Van Deynze, A.E.; Landry, B.S.; Pauls, K.P. The identification of restriction fragment length polymorphisms linked to seed colour genes in *Brassica napus*. *Genome* **1995**, *38*, 534-542.
- Van Deynze, A.E.; Pauls, K.P. The inheritance of seed colour and vernalization requirement in *Brassica napus* using doubled haploid populations. *Euphytica* **1994b**, *74*, 77-83.
- Van Soest, P.J. Symposium on nutrition and forages and pastures: New chemical procedures for evaluating forages. *J. Animal Sci.* **1964**, *23*, 838-864.
- Velasco, L.; Matthäus, B.; Möllers, C. Nondestructive assessment of sinapic acid esters in Brassica species: I. Analysis by near infrared reflectance spectroscopy. *Crop Sci.* **1998**, *38*, 1645-1650.

- Wang, H.Z.; Liu, H.L. Genetic analysis of seed color instability in yellow-seeded *Brassica napus* L. In: Proceedings of 8<sup>th</sup> International Rapeseed Congress, Saskatoon, Canada, **1991**, 4, 211-218.
- Wei, Y.; Li, Y.; Lu, J.; Tang, Z.; Pu, D.; Chai, Y. Molecular cloning of *Brassica napus* *TRANSPARENT TESTA 2* gene family encoding potential MYB regulatory proteins of proanthocyanidin biosynthesis. *Mol. Biol. Rep.* **2007**, 34, 105-120.
- Wolfram, K.; Schmidt, J.; Wray, V.; Milkowski, C.; Schliemann, W.; Strack, D. Profiling of phenylpropanoids in transgenic low-sinapine oilseed rape (*Brassica napus*). *Phytochemistry* **2010**, 71, 1076-1084.
- Yan, X.Y.; Li, J.N.; Fu, F.Y.; Jin, M.Y.; Chen, L.; Liu, L.Z. Co-location of seed oil content, seed hull content and seed coat color QTL in three different environments in *Brassica napus* L.. *Euphytica* **2009**, 170, 355-364.
- Zaman, M.W. Potential for species introgression in *Brassica napus* with special reference to earliness and seed color. *Dissertation*, Department of Plant Breeding, Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, Schweden, **1987**.
- Zum Felde, T.; Baumert, A.; Strack, D.; Becker, H.C.; Möllers, C. Genetic variation for sinapate ester content in winter rapeseed (*Brassica napus* L.) and development of NIRS calibration equations. *Plant Breeding* **2007**, 126, 291-296.

### Internetseiten:

[www.bauernverband.de](http://www.bauernverband.de), DBV Erntebericht **2011** (November 2011)  
[www.burcon.ca](http://www.burcon.ca) (Januar 2012)  
[www.FAOSTAT.com](http://www.FAOSTAT.com) (Oktober 2011)  
[www.oilworld.biz](http://www.oilworld.biz) (Oktober 2011)  
[www.ufop.de](http://www.ufop.de), UFOP Marktinformationen November **2011**

## 8 Abbildungs-, Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis

### Abbildungen:

**Abbildung 1:** Verbrauch von Pflanzenölen in Deutschland 2009 ([www.oilworld.biz](http://www.oilworld.biz))

**Abbildung 2:** Verbrauch von Eiweißfuttermitteln in Deutschland 2009 ([www.oilworld.biz](http://www.oilworld.biz))

### Tabellen:

**Tabelle 1:** Inhaltstoffzusammensetzung von Rapsextraktionsschrot (RES) und Rapskuchen im Vergleich zu Sojaextraktionsschrot (SES) (vgl. Lindermayer *et al.* 2010)

### Abkürzungen:

AA	Genombezeichnung von <i>Brassica rapa</i>
ADF	acid detergent fibre
ADL	acid detergent lignin
AABB	Genombezeichnung von <i>Brassica juncea</i>
AACC	Genombezeichnung von <i>Brassica napus</i>
BC	Backcross, Rückkreuzung
BBCC	Genombezeichnung von <i>Brassica carinata</i>
CC	Genombezeichnung von <i>Brassica oleracea</i>
CAD	<i>CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE</i>
CCR	<i>CINNAMOYL CoA REDUCTASE</i>
DH	Doppel Haploid
ExV8-DH	Winterrapspopulation aus der Kreuzung zwischen ‚Express617‘ und ‚V8‘
F1	1. Filial-Generation
F2	2. Filial-Generation
G	Guaiacyl Monolignol-Einheit
GSL	Glucosinolate, Senfölglycoside
h <sup>2</sup>	Heritabilität; Erblichkeit
H	Hydroxyphenyl Monolignol-Einheit
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektroskopie

---

NDF	neutral detergent fibre
NIRS	Nahinfrarot-Reflektionsspektroskopie
QTL	Quantitative Trait Loci
r	Korrelationskoeffizienten
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß der Validierung
R <sup>2</sup> <sub>cv</sub>	Bestimmtheitsmaß der Kreuzvalidierung
RES	Rapsextraktionsschrot
RIL	Rekombinanten Inzuchtlinien
RNAi	RNA <i>interference</i>
S	Syringil Monolignol-Einheit
SCE	<i>SINAPIN ESTERASE</i>
SCT	<i>SINAPOYLGLUCOSE:CHOLIN-SINAPOYLTRANSFERASE</i>
SEC	Standardfehler der Kreuzvalidierung
SEP	Standardschätzfehler
SES	Sojaextraktionsschrot
SGT	<i>UDP-GLUCOSE:SINAPINSÄURE-GLUCOSYL-TRANSFERASE</i>
SMT	<i>SINAPOYLGLUCOSE L-MALAT SINAPOYLTRANSFERASE</i>
SPE	solid phase extraction
TT	Transparent Testa
TMA	Trimethylamin
Ye2-DH	Winterrapspopulation aus der Kreuzung zwischen ‚1012-98‘ und ‚Express617‘
0-Rapssorten	Qualitätsbezeichnung für erucasäurearmen Raps
00-Rapssorten	Qualitätsbezeichnung für erucasäure- und glucosinolatarmen Raps

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. W. Friedt möchte ich für die Überlassung des sehr spannenden Themas und die Übernahme des ersten Gutachtens danken. Besonders danke ich für die sehr gute fachliche und kollegiale Betreuung während meiner Doktorandenzeit.

Herrn Prof. Dr. U. Wenzel danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. R. Snowden gilt mein spezieller Dank für seine kompetente, wissenschaftliche und nicht zuletzt freundschaftliche Betreuung und Unterstützung bei Planung, Durchführung, Diskussion und Durchsicht der angefertigten Publikationen und Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Petra Degen, Birgit Keiner, Swetlana Renner und Nelly Weis für die tatkräftige technische Unterstützung bei der Durchführung der unterschiedlichen Laborarbeiten.

Für die Durchführung der Feldversuche und die züchterische Unterstützung danke ich vor allem Mechthild Schwarte sowie Mario Tolksdorf und Malte Luh. Auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Feldversuchsstationen in Rauischholzhausen, Gießen und Groß-Gerau sei hiermit gedankt.

Meinen Bürokollegen Anke Gehringer, Florin Lipsa, Anna Stein und Wubishet Bekele danke ich für die gute und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre während und nach der Arbeitszeit.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Lehrstuhles für Pflanzenzüchtung für die gute Zusammenarbeit und die stets lustigen und aufregenden Zeiten während den unterschiedlichsten Situationen meiner Doktorandenzeit.

Vor allem möchte ich meiner Frau und meinen Eltern herzlich für ihre Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen danken, die dadurch ebenso zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

## **Eidesstattliche Erklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Biskirchen, im März 2012

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**